

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciálně chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Anna Komrsková

Role proteinkináz ve výstavbě dělicího vřeténka a segregaci chromozomů
v meióze savčích oocytů

The role of protein kinases in spindle formation and chromosome segregation
during mammalian oocyte meiosis

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Dávid Drutovič, Ph.D.

Praha, 2020

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu a je totožná s elektronickou verzí vloženou do SIS.

V Praze, dne 4.června 2020

.....

Anna Komrsková

Poděkování

Děkuji svému školiči RNDr. Dávidovi Drutovičovi, Ph.D., za jeho nekonečnou trpělivost, cenné rady a čas, který mi věnoval. Také děkuji své rodině a nejbližším za podporu a důvěru, kterou do mě vložili.

Abstrakt

Správně vytvořené dělicí vřeténko během prvního meiotického dělení u savčích oocytů je důležité pro správnou segregaci chromozomů. Proteinkinázy z rodin Aurora kináz a Polo-like kináz jsou důležitou součástí signálních drah, které se zúčastňují tvorby dělicího vřeténka a podílí se na segregaci chromozomů. Obě rodiny kináz hrají v těchto procesech specifickou roli jak samostatně, tak ve vzájemné kooperaci. Po nesprávném vytvoření dělicího vřeténka často následuje chybná segregace chromozomů, která může vést ke vzniku aneuploidií. Některé aneuploidie způsobují neplodnost, jiné však vedou ke vzniku vrozených vad, jako je např. Downův syndrom. Meióza u žen je náchylnější na chyby v segregaci chromozomů než mitóza, meióza během spermatogeneze či meióza samičích pohlavních buněk u jiných organismů. Tato tendence činí výzkum Aurora kináz a Polo-like kináz velice lákavým a eventuálně velmi přínosným v kontextu lidské reprodukce.

Klíčová slova

Meióza, oocyty, dělicí vřeténko, mikrotubuly organizující centra, proteinkinázy, Aurora kinázy, Polo-like kinázy

Abstract

Correctly assembled spindle during the first meiotic division is crucial for proper chromosome segregation. Protein kinases from Aurora kinase and Polo-like kinase families are an essential part of mechanisms that affect spindle assembly and take part in chromosome segregation. These kinases play a very specific role in these processes both individually and in cooperation. A defective spindle assembly is often followed by incorrect chromosome segregation, that can lead to aneuploidy. Some aneuploidies cause infertility, others lead to birth defects like Down's syndrome. Human oocyte meiosis is more sensitive to errors in chromosome segregation than mitosis, meiosis in human sperm or meiosis in female gametes in other organisms. This tendency makes the research of Aurora kinases and Polo-like kinases very appealing and eventually rewarding in the context of human reproduction.

Keywords

Meiosis, oocytes, spindle, microtubule-organising centers, protein kinases, Aurora kinases, Polo-like kinases

Obsah

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	6
SEZNAM ZKRATEK	7
ÚVOD	9
1 BUNĚČNÉ DĚLENÍ	10
1.1 Gametogeneze a folikulogeneze.....	12
1.2 Výstavba dělicího vřeténka v mitóze a meióze	15
1.2.1 Mikrotubuly organizující centra.....	15
1.2.2 Signální dráhy účastníci se výstavby dělicího vřeténka.....	17
1.3 Segregace chromozomů	18
2 PROTEINKINÁZY REGULUJÍCÍ BUNĚČNÉ DĚLENÍ.....	20
2.1 Aurora kinázy.....	22
2.1.1 Aurora kináza A	23
2.1.2 Aurora kináza B	26
2.1.3 Aurora kináza C	27
2.2 Polo-like kinázy.....	28
2.2.1 Polo-like kináza 1	28
2.2.2 Polo-like kináza 4.....	30
2.3 Kooperace Aurora kináz a Polo-like kináz	31
ZÁVĚR.....	33
POUŽITÁ LITERATURA.....	34

Seznam ilustrací a tabulek

Obr. 1 Schéma separace sesterských chromatid v mitóze	11
Obr. 2 Bivalent homologních chromozomů.....	12
Obr. 3 Schéma segregace homologních chromozomů a separace sesterských chromatid v meióze.....	13
Obr. 4 Oocyt od znovuzahájení meiózy po oplození.....	14
Obr. 5 Formace acentrozomálního dělicího vřeténka v meióze I savčích oocytů.....	16
Obr. 6 Změny lokalizace Aurora kináz v meióze oocyty	24
Tab. 1 Shrnutí funkcí regulačních proteinkináz v mitóze	22
Tab. 2 Shrnutí charakteristik Aurora kináz v meióze	23

Seznam zkratk

APC/C	Anafázi podporující komplex/cyklozom (z angl. anaphase-promoting complex/cyclosome)
AURK	Aurora kinázy
AURKA	Aurora kináza A
AURKB	Aurora kináza B
AURKC	Aurora kináza C
Bora	z angl. protein aurora borealis
BUB1	z angl. budding uninhibited by benzimidazoles 1
CDK	Cyklin-dependentní kinázy
CDK5RAP2	Protein asociovaný s regulační podjednotkou CDK5 (z angl. CDK5 regulatory subunit associated protein 2)
CEP192	Centrozomální protein 192
CHC17	Těžký řetězec klathrinu (z angl. clathrin heavy chain 17)
CIP2A	Buněčný inhibitor PP2A (z angl. cellular inhibitor of PP2A)
cKO	Kondicionální knock-out (z angl. conditional knockout) – inaktivace genu Kondicionálně ve specifických buněčných typech
C-NAP1	Centrozomální protein asociovaný s Nek2 (z angl. centrosomal Nek2-associated Protein 1)
CPC	z angl. chromosomal passenger complex
D-box	Destrukční box
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
FSH	Folikulostimulační hormon
G1	Mezera 1 (z angl. Gap 1)
G2	Mezera 2 (z angl. Gap 2)
GDP	Guanosindifosfát
GTP	Guanosintrifosfát
GV	Zárodečný váček (z angl. germinal vesicle)
GVBD	Rozpad zárodečného váčku (z angl. germinal vesicle breakdown)
HURP	z angl. hepatoma up-regulated protein
ICA	Vnitřní osa chromatidy (z angl. inner chromatid axis)
INCENP	Vnitřní centromerický protein (z angl. inner centromere protein)
kDA	Kilodalton
KO	Genový knockout – inaktivace genu v celém organismu
LISD	z angl. Liquid-like meiotic spindle domain

M	Mitotická fáze
MPF	Maturaci podporující faktor
mRNA	Messengerová ribonukleová kyselina (z angl. messenger ribonucleic acid)
MTOC	Mikrotubuly organizující centra
MYT1	Myelinový transkripční faktor (z angl. myelin transcription factor 1)
NEBD	Rozpad jaderné membrány (z angl. nuclear envelope breakdown)
NEK	Kinázy příbuzné NIMA (z angl. NIMA-related kinases)
NES	Jaderný exportní signál (z angl. nuclear export signal)
NIMA	z angl. never in mitosis in <i>Aspergillus nidulans</i>
NLS	Jaderný lokalizační signál (z angl. nuclear localization signal)
NPC	Jaderné póry (z angl. nuclear pore complex)
NTR	Jaderné transportní receptory (z angl. Nuclear Transport Receptors)
Numa	Protein jaderného mitotického aparátu (z angl. nuclear mitotic apparatus protein)
PCM	Pericentriolární materiál
PLK	Polo-like kinázy
PP2A	Proteinfosfatáza 2A (z angl. protein phosphatase 2A)
Ran	Nukleární protein podobný proteinu Ras (z angl. Ras-like protein)
RanBP1/2	Protein vázající Ran (z angl. Ran binding protein 1/2)
RanGAP1	Ran GTPázu aktivující protein (z angl. Ran GTPase-activating protein)
RCC1	Regulátor kondenzace chromozomů (z angl. regulator of chromosome condensation)
RNAi	RNA interference
S	Syntéza, fáze syntézy DNA v buněčném cyklu
SAC	Kontrolní bod výstavby dělicího vřeténka (z angl. spindle assembly checkpoint)
SAF	Faktor podporující výstavbu dělicího vřeténka (z angl. spindle assembly factor)
SUMO	Malý modifikační protein podobný ubikvitinu (z angl. small ubiquitin-like modifier)
T smyčka	Telomerická smyčka
TACC3	z angl. transforming acidic coiled-coil containing protein 3
TPX2	z angl. targeting protein for Xklp2
WEE1	z angl. western equine encephalitis
WT	Divoký typ, z angl. wild type
Xklp2	z angl. Xenopus kinesin-like protein 2

Úvod

Pochopení mechanismů eukaryotického buněčného dělení je klíčem k odpovědím na otázky, které si mnozí kladou ve spojitosti s buněčnou biologií a lidským zdravím. Dnešní moderní doba nám nabízí mnoho možností, kterými můžeme zkoumat průběh a regulaci dvou známých typů eukaryotického buněčného dělení, mitózy a meiózy. Jejich optimální průběh je základem pro vznik správně fungujících buněk. Chyby v regulaci mitózy často vedou ke ztrátě kontroly nad dělením a následnému rakovinnému bujení. Meióza dává vzniku pohlavním buňkám (gametám) – spermii a oocytům. Její regulace tedy hraje velmi významnou roli ve vzniku funkčních gamet a po jejich splnutí i ve vzniku embrya schopného dalšího vývoje.

V poslední době jsou v oblasti meiózy častým objektem studií regulační proteinkinázy, které se spolu s dalšími regulačními složkami meiózy významně podílejí na výstavbě meiotického dělicího vřeténka a na správné segregaci chromozomů. Snížení aktivity či úplná absence jednotlivých proteinkináz různým způsobem narušuje tyto procesy. Chyby ve vzniku dělicího vřeténka vedou k chybné segregaci chromozomů a následnému vzniku numerických aberací, tedy zvýšení či snížení optimálního počtu chromozomů v dceřiné buňce. Zejména u oocytů to může mít za následek neplodnost či vznik vrozených vad, jako je Downův syndrom.

V této práci se zaměřím zejména na Aurora kinázy a Polo-like kinázy, jak tyto kinázy regulují výstavbu dělicího vřeténka a následnou segregaci chromozomů u savčích oocytů a jak se jejich role v savčích oocytech liší od role v mitotických buňkách. Výstavba dělicího vřeténka po znovuzahájení meiózy je kritickým okamžikem pro vznik vajíčka se správným počtem chromozomů. Aurora kinázy a Polo-like kinázy tento proces významně ovlivňují, a kromě samotné výstavby dělicího vřeténka regulují vznik stabilních vazeb mikrotubul a kinetochor.

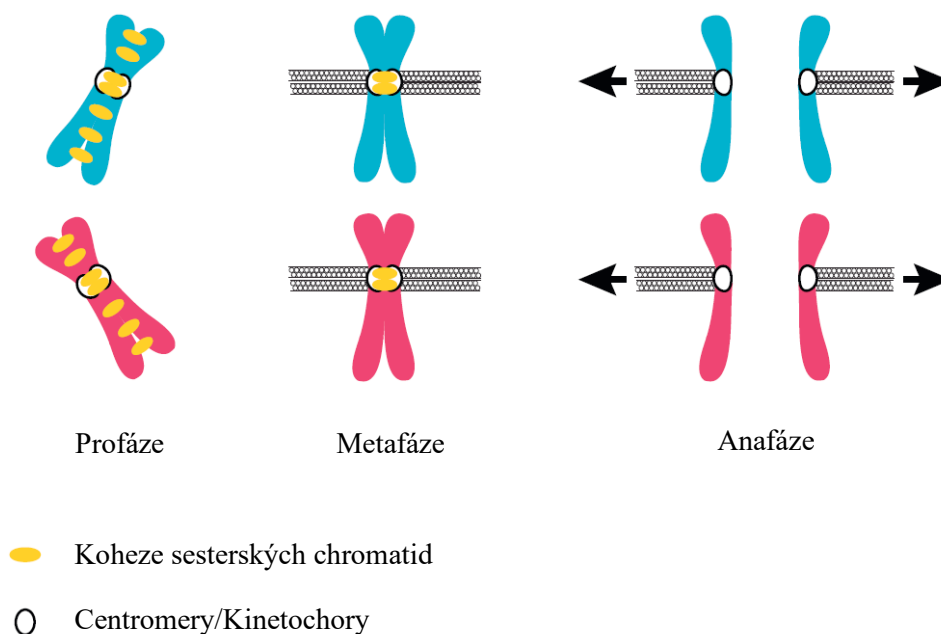
Cílem práce je vytvoření literární rešerše shrnující dosavadní poznatky o zapojení Aurora a Polo-like kináz ve výstavbě bipolárního dělicího vřeténka v meióze savčích oocytů, porovnání s jejich rolí v mitóze a popsání vzájemného vztahu těchto kináz.

1 Buněčné dělení

Buněčné dělení je přísně regulovaný proces, při kterém se jedna původní mateřská buňka dělí na nové, dceřiné buňky. Buněčný cyklus je souhrn procesů, kterými buňka roste, replikuje svoji genetickou informaci a dělí se. Dá se rozčlenit do čtyř hlavních fází: G1, S, G2 a M fáze. G1, S, a G2 fáze se souhrnně nazývají interfáze, tedy fáze, ke kterým dochází mezi jednotlivými děleními. Během interfáze dochází k růstu buněčných organel i samotné buňky, a k replikaci DNA. G1 fáze (mezera 1, z angl. Gap 1) následuje po rozdělení buňky a je intervalem mezi samotným dělením a syntézou DNA, kdy buňka roste bez replikace genetické informace. Následuje S fáze (syntéza, z angl. synthesis), při níž dochází k replikaci DNA. Následně začíná G2 fáze (mezera 2, z angl. Gap 2), během které se buňka připravuje na nadcházející dělení, pokračuje ve zvětšování svého objemu a syntetizuje potřebné proteiny. M fáze (mitotická fáze) se pak dá rozdělit na samotnou mitotickou fázi, při které se dělí samotný genetický materiál jádra buňky, a fázi cytokineze, kdy dochází k rozdělení cytoplazmy a následně celé buňky, za vzniku dvou dceřiných buněk. Mitotická fáze se dále dělí na profázi, metafázi, anafázi a telofázi (Schafer, 1998; Cooper, 2000; Yanagida, 2014).

Známe dva hlavní typy buněčného dělení u eukaryot – mitózu a meiózu. Hlavním rozdílem v těchto dvou děleních je výsledný počet sad chromozomů v nově vzniklých dceřiných buňkách. Mitóza dává vzniknout identickým diploidním buňkám (s duplikovanou sadou chromozomů) z jedné původní, mateřské buňky. Meiózou vznikají haploidní buňky, tedy buňky s jednou sadou chromozomů. Z jedné diploidní buňky vzniknou čtyři haploidní, geneticky odlišné buňky, za účelem pohlavního rozmnožování - gamety (Ohkura, 2015; Ong a Torres, 2019).

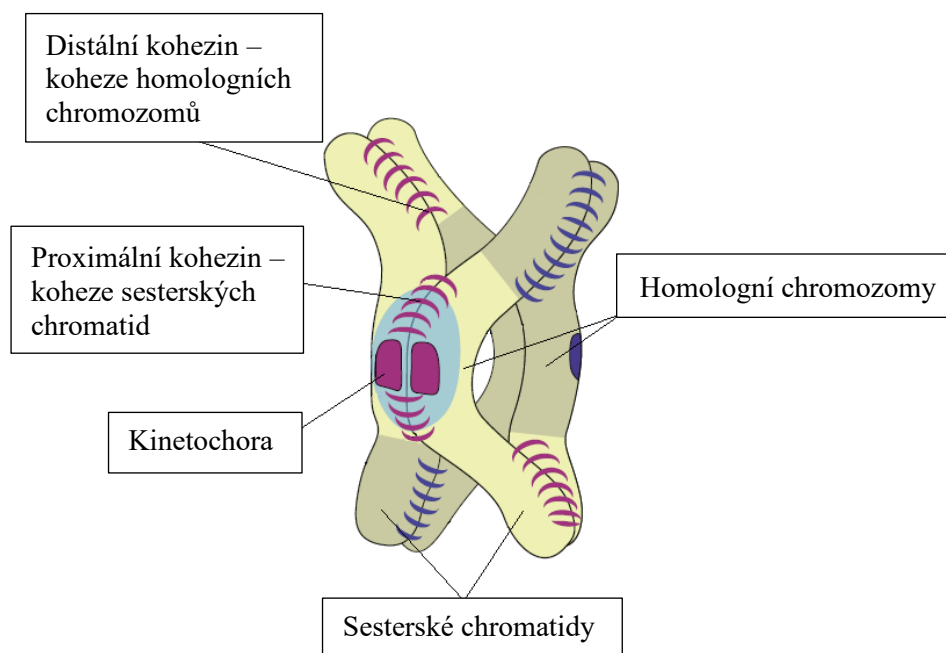
Během profáze mitotického dělení je duplikovaná DNA kondenzována do chromozomů, které jsou tvořeny dvěma chromatidami – identickými vlákny DNA vzniklými replikací. Mimo kondenzaci chromozomů dochází během této fáze v cytoplazmě k počátku vzniku dělicího vřeténka. V oblasti centromery se nachází proteinový komplex nazývaný kinetochor, na ten jsou v metafázi připojeny mikrotubuly vycházející z polárních centriol, což jsou cylindrické struktury složené z mikrotubulů, které se spolu s pericentriolárním materiálem (PCM) nachází v centrozomech (Cheeseman, 2014). Chromozomy s oběma chromatidami napojenými na mikrotubuly jsou seřazeny do tzv. metafázní roviny, následně během anafáze jsou sesterské chromatidy odděleny a odtaženy mikrotubuly na opačné póly buňky (viz obr.1). Zároveň se mikrotubuly prodlužují, čímž od sebe oddalují oba póly buňky (viz obr.1). Počet chromozomů v dceřiných buňkách je stejný jako u mateřské buňky, každá dceřiná buňka dostane jednu chromatidu od každého chromozomu (Cooper, 2000; Hirano, 2015).



Obr. 1 Schéma separace sesterských chromatid v mitóze (Severson a kol., 2016, převzato a upraveno)

Meióza se dělí na meiotické dělení I a meiotické dělení II. Během meiotického dělení I dochází k párování a kovalentnímu spojení homologních chromozomů, tyto páry tvoří tzv. bivalentů (viz obr. 2) (Page a Hawley, 2003; Ohkura, 2015). Profáze prvního meiotického dělení (profáze I) se dělí na pět dalších stádií – leptotén, zygotén, pachytén, diplotén a diakinezi. Během stadia leptotén je chromatin kondenzován do chromozomů. Homologní chromozomy od obou rodičů jsou v průběhu stadia zygotén spojeny do bivalentů. V tomto spojení dochází při stadiu pachytén k homologní rekombinaci, tzv. crossing-over. Během crossing-overu dochází mezi homologními chromozomy k výměně genetického materiálu. Místo, kde dochází ke kontaktu chromozomů během homologní rekombinace se nazývá chiasma. Během posledního stadia profáze I, diploténu, se od sebe bivalenty chromozomů začínají vzdalovat, ale stále zůstávají spojeny v chiasma (Cooper, 2000; Severson a kol., 2016).

Fáze následující po profázi I probíhají podobně, jako v mitóze. V metafázi I se mikrotubuly napojí na kinetochor každého homologu a bivalenty se seřadí do metafázní roviny. V anafázi I dojde k uvolnění chiasmatického spojení a dochází k segregaci celých chromozomů, nikoliv chromatid, jako tomu je u mitózy (Buonomo a kol., 2000). Meiotické dělení II probíhá podobně jako mitóza: sesterské chromatidy jsou připojeny na mikrotubuly a otaženy na opačné póly buňky (viz obr. 3) (Ohkura, 2015).

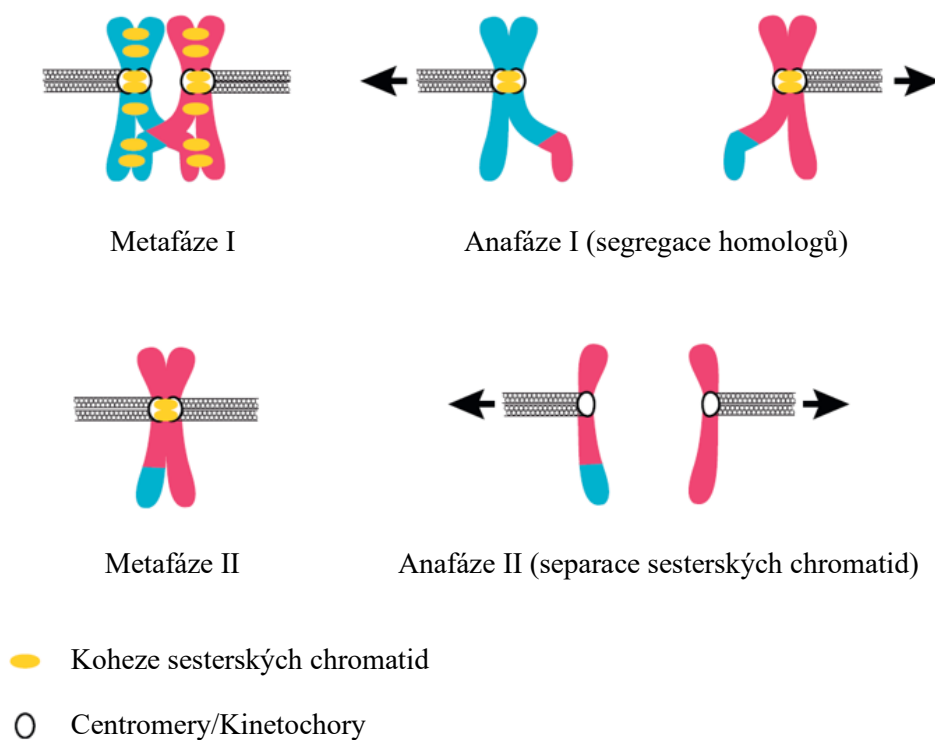


Obr. 2 Bivalent homologních chromozomů (Webster a Schuh, 2017, převzato a upraveno)

1.1 Gametogeneze a folikulogeneze

Meióza hraje velice důležitou roli v gametogenezi, tedy vzniku pohlavních buněk. Samčí pohlavní buňky – spermie – vznikají po celý život jedince, a to klasickým meiotickým dělením. Spermie z profáze I dále pokračují v dělení a plynule přecházejí i do druhého meiotického dělení, které záhy dokončují. Z jedné původní diploidní buňky vzniknou čtyři stejně velké haploidní buňky, každá s odlišnou genetickou informací (Brinster, 2007).

Oogeneze je o něco komplikovanější proces, oocyty totiž narozdíl od spermií celý život nevznikají (Webster a Schuh, 2017). Oocyty začínají vznikat během prenatálního vývoje. Prekurzorem oocyty jsou diploidní oogonie, které mitotickým dělením zvyšují své počty. Po zmnožení začnou oogonie růst zvětšováním objemu cytoplazmy, vstoupí do prvního meiotického dělení a dochází k homologní rekombinaci. Oocyt projde prvními čtyřmi stadii profáze I. Před posledním stadiem se meiotické dělení zastaví. Toto stadium meiózy, ve které oocyt zůstává beze změny, až do dosažení pohlavní dospělosti jedince, se nazývá diktyotén. Tzv. GV oocyty (zárodečný váček, z angl. germinal vesicle) se zachovalou jadernou membránou zůstávají v tomto stadiu a ke znovuzahájení meiózy dojde až po hormonální stimulaci, která přirozeně nastává během ovulace (Pepling, 2006; MacLennan a kol., 2015).



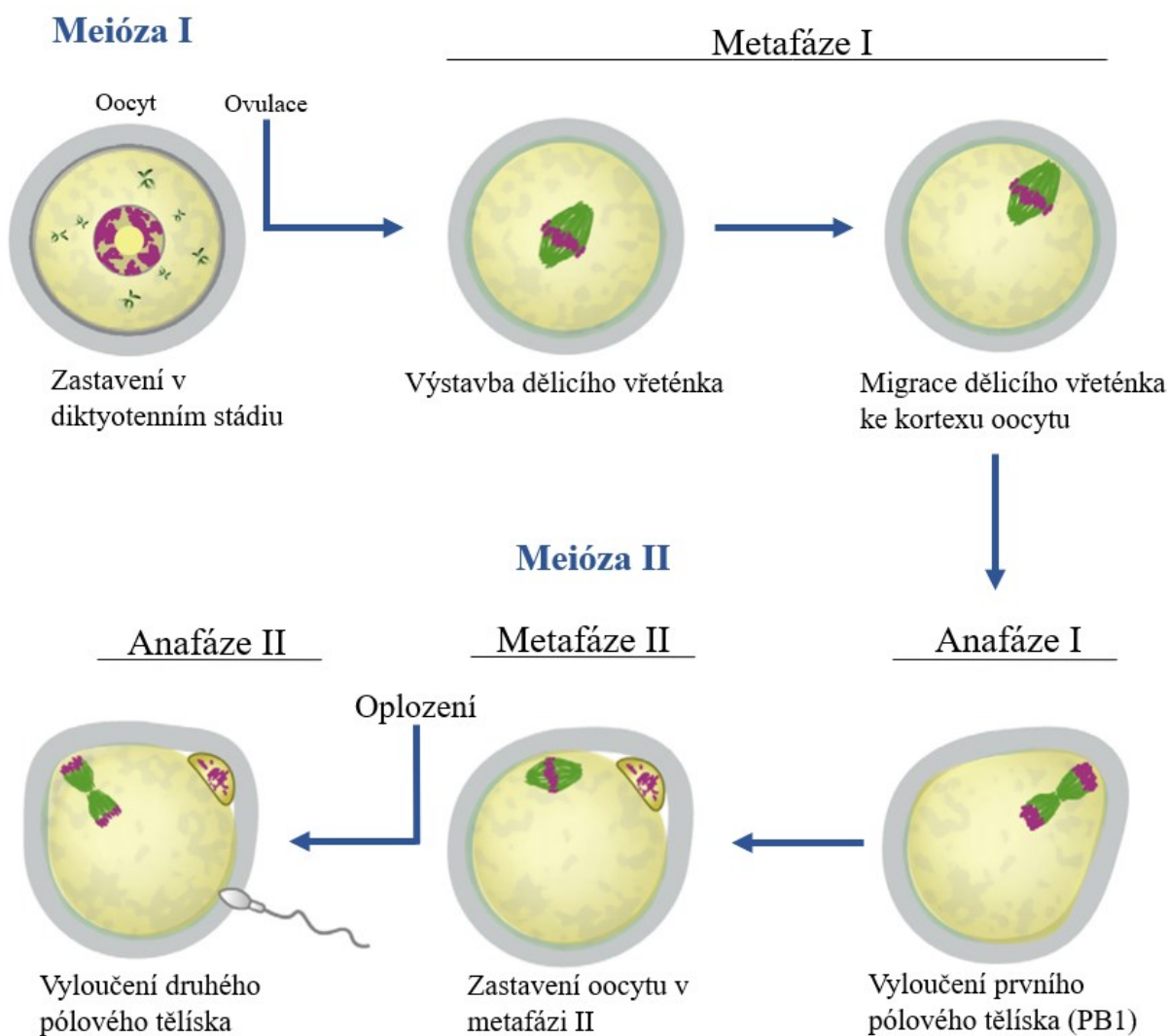
Obr. 3 Schéma segregace homologních chromozomů a separace sesterských chromatid v meióze (Severson a kol., 2016, převzato a upraveno)

Spolu s oocyty se vyvíjejí i primordiální folikuly, ve kterých jsou obsaženy oocyty zastavené v profázi I a prefolikulární buňky (z těch se později stávají folikulární buňky). Folikul se dále vyvíjí, z plochých prefolikulárních buněk se stávají čtvercové folikulární buňky a z primordiálního folikulu se stává primární folikul. Folikulární buňky se v pozdějších vývojových fázích folikulu diferencují na kumulární buňky, které jsou v bezprostřední blízkosti oocyty a vyživují ho, a buňky obklopující stěnu folikulu (vzniká *membrana granulosa*), které produkují pohlavní hormony. Folikul se po vzniku dvou vrstev granulózních buněk značí jako sekundární folikul. Prostor mezi vrstvami folikulárních buněk je vyplněn tekutinou a stále se zvětšuje až do stádia označovaného jako Graafův folikul, které je posledním stádiem vývoje folikulu před ovulací. Během menstruačního cyklu ve fázi ovulace je z hypotalamu uvolněn gonadotropin uvolňující hormon, ten následně stimuluje sekreci folikulostimulačního hormonu (FSH, z angl. follicle-stimulating hormone) z adenohypofýzy, který podporuje zrání folikulů. Granulózní buňky po stimulaci FSH produkují estradiol, ten působí na adenohypofýzu a z té je v reakci na estradiol sekretován luteinizační hormon. V důsledku hormonální stimulace dojde k prasknutí folikulu a uvolnění oocyty z vaječníku (Channing a kol., 1980; Canipari, 2000; Rimon-Dahari a kol., 2016).

Po dosažení puberty začne žena periodicky ovulovat, tedy uvolňovat oocyty z vaječníků. Dojde k znovuzahájení meiózy, pro což je charakteristický rozpad jaderné membrány GV oocyty (GVBD, z angl. germinal vesicle breakdown). Po GVBD je DNA kondenzována do chromozomů a započne výstavba

dělicího vřeténka. Uvolněný oocyt dokončí první meiotické dělení, během něhož metafázní vřeténko migruje k membráně oocyty a dochází k asymetrickému dělení, tedy k vyloučení prvního pólóvého tělíska a s ním části genetické informace (viz obr. 4) (Gilbert SF, 2000; Verlhac a kol., 2000).

Oocyt pak vstupuje do druhého meiotického dělení, s čímž vzniká druhé meiotické vřeténko a oocyt se nyní zastavuje v metafázi II. V této fázi už zralé vajíčko čeká na oplození spermií, které znovu spustí meiotické dělení a nyní ji kompletně dokončuje za vzniku druhého pólóvého tělíska. Následuje splnutí samčího a samičího prvojádra a embryogeneze (Webster a Schuh, 2017).



Obr. 4 Oocyt od znovuzahájení meiózy po oplození (Webster a Schuh, 2017, převzato a upraveno)

1.2 Výstavba dělicího vřeténka v mitóze a meióze

Stěžejním procesem pro to, aby buněčné dělení proběhlo bez chyb a došlo ke správnému rozdělení chromozomů, je výstavba funkčního dělicího vřeténka. Jako dělicí vřeténko označujeme polarizované mikrotubuly, které se během buněčného dělení připojí na chromozomy a jejich zkracováním jsou od sebe chromozomy nebo jen chromatidy odtrženy, a jsou odtaženy na opačné póly dělicího vřeténka (Clift a Schuh, 2015).

Meiotické dělicí vřeténko je u oocytů kvůli jejich velikosti nejen větší než mitotické, ale kvůli snaze zachovat si většinu cytoplazmy, je také asymetricky umístěno k membráně. K tomu dochází za pomoci aktinového cytoskeletu, který je potřebám oocyty přizpůsoben. Mechanismy ovlivňující jeho výstavbu musí spolupracovat, aby se chromozomy nejen správně rozdělily, ale aby s jejich vyloučením v podobě pólového tělíska došlo ke ztrátě co nejmenšího objemu cytoplazmy (Verlhac a kol., 2000; Severson a kol., 2016).

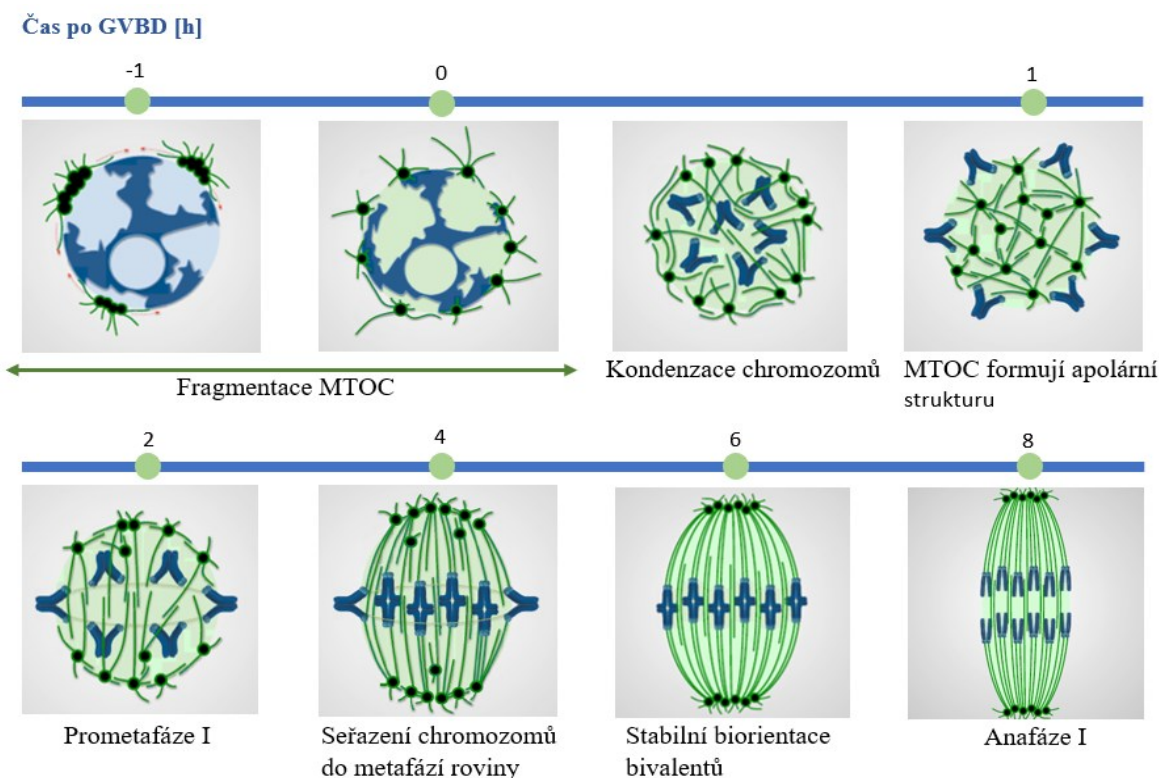
1.2.1 Mikrotubuly organizující centra

U somatických buněk během mitózy k výstavbě dělicího vřeténka přispívají zejména centrozomy. Jedná se o orgány obsahující jeden pár centriol obklopený pericentriolárním materiálem. Centrozomy se během S fáze buněčného dělení duplikují a přesouvají se na protilehlé póly buňky, čímž umožňují vznik bipolárního dělicího vřeténka. Tyto orgány se zaslouhují nejen o nukleaci mikrotubulů, ale také jejich ukotvení (Vertii a kol., 2016).

Oproti somatickým buňkám, savčí oocyty během svého vzniku centrioly ztrácí a objevují se v nich až po oplození, kdy je právě spermie přináší do buňky (Courtois a kol., 2012). Proto oocyty využívají pro výstavbu dělicího vřeténka mnohočetné acentriolární mikrotubuly organizující centra (MTOC), které regulují nukleaci, rozmístění a funkci mikrotubulů. Podle některých zdrojů k výstavbě dělicího vřeténka přispívá přes 80 MTOC (Schuh a Ellenberg, 2007). MTOC jsou složeny z proteinů pericentriolárního materiálu (podobně jako u centrozomů), jako např. pericentrin (Carabatsos a kol., 2000), γ -tubulin (Gueth-Hallonet a kol., 1993), CEP192 (centrozomální protein 192) (Clift a Schuh, 2015), CDK5RAP2 (Protein asociovaný s regulační podjednotkou CDK5, z angl. CDK5 regulatory subunit associated protein 2) (Balboula a kol., 2016) a mnoho dalších proteinů. Jejich funkce je nezávislá na centriolách, její podstatou je fragmentace MTOC kolem GVBD a následné shlukování MTOC v metafázi. Krátce po GVBD se tvoří shluk mikrotubulů a fragmentované MTOC v oblasti dělicího vřeténka tvoří apolární strukturu. Po fragmentaci se MTOC přemisťují a shlukují na opačných pólech dělicího vřeténka, čímž vytvářejí ideálně dva rovnoměrné póly dělicího vřeténka (viz obr. 5). Chyby ve fragmentaci MTOC vedou ke vzniku různě defektních dělicích vřetének, ta mívají více než dva póly, nebo se při snaze o segregaci chromozomů hroutí (Schuh a Ellenberg, 2007). Také nesprávné shlukování MTOC může i přes vznik bipolárního dělicího

vřeténka vést ke špatnému rozdělení chromozomů (Nguyen a kol., 2014; Clift a Schuh, 2015; Balboula a kol., 2016).

U myších, kravských, ovčích a prasečích oocytů byla So a kol (2019) objevena doména kolem dělicího vřeténka, kde se proteiny pohybují dynamicky a mohou se v této doméně velmi rychle přemísťovat. Tato oblast vzniká pouze oddělením fází, tedy není od okolí oddělena membránou. Obsahuje proteiny účastníci se výstavby dělicího vřeténka a chová se jako tekutina, proto byla nazvána jako „Liquid-like meiotic spindle domain“ (LISD). Jedná se nejspíš o strukturu vyskytující se výhradně u oocytů. V této doméně jsou lokalizovány centrozomální proteiny, proteiny vážící se na minus konec mikrotubulů, proteiny asociované s dyneinem a proteiny řídící nukleaci mikrotubulů a ovlivňující jejich stabilitu. Doména je rozdělena do fází a všechny zmíněné proteiny se mohou dynamicky pohybovat podél oblasti dělicího vřeténka, proto se doména označuje jako tekutá. Jakékoliv narušení LISD způsobí uvolnění regulačních proteinů do cytoplazmy a následně vzniku defektního dělicího vřeténka. Proteiny obsažené v LISD jsou z velké části prozkoumané v kontextu mitózy, specifika jejich role v meióze prostřednictvím LISD prozatím zůstávají předmětem studií. Objev LISD poskytuje nový pohled na tvorbu acentrozomálního dělicího vřeténka u savčích oocytů (So a kol., 2019).



Obr. 5 Formace acentrozomálního dělicího vřeténka v meióze I savčích oocytů (MTOC černě, DNA modře, mikrotubuly zeleně) (Mihajlović a FitzHarris, 2018, převzato a upraveno)

1.2.2 Signální dráhy účastníci se výstavby dělicího vřeténka

Výstavba dělicího vřeténka je komplexní proces, který zahrnuje vytvoření dvou pólů, organizaci mikrotubulů do bipolárního dělicího vřeténka a vytvoření stabilní vazby kinetochor a mikrotubulů. (Foley a Kapoor, 2013; Kapoor, 2017). U meiotických buněk navíc dochází ke dvěma po sobě jdoucím dělením, meióze I a meióze II, kterým dělicí vřeténko musí být přizpůsobeno. Vznik dělicího vřeténka v mitotických buňkách a v oocytech podléhá mnoha podobným mechanismům, jako je CPC (z angl. Chromosomal passenger complex) a Ran-GTP-importin β signalizace a účast regulačních proteinkináz. Závislost výstavby dělicího vřeténka na těchto drahách se liší u různých buněčných typů. (Mogessie a kol., 2018; Mullen a kol., 2019).

Ve všech buňkách, které obsahují jádro, Ran molekuly (Nukleární protein podobný proteinu Ras, z angl. Ras-like nuclear protein) regulují transport mezi jádrem a cytoplazmou. Vyskytuje se ve dvou formách, aktivní Ran-GTP a neaktivní Ran-GDP. RCC1 (Regulátor kondenzace chromozomů, z angl. regulator of chromosome condensation) je protein, který v molekule Ran-GDP vyměňuje GDP (Guanosindifosfát) za GTP (Guanosintrifosfát). Komplex proteinu RanGAP1 (protein aktivující Ran GTPázu, z angl. Ran GTPase-activating protein) a RanBP1/2 (protein vázající Ran 1/2, z angl. Ran binding protein 1/2) pak podporují hydrolyzu GTP na GDP. RCC1 (Regulátor kondenzace chromozomů, z angl. regulator of chromosome condensation) se váže na chromatin, kdežto RanGAP1/ RanBP2 jsou přítomny v cytoplazmě. Následkem toho je v jádře vysoká koncentrace Ran-GTP (Clarke a Zhang, 2008).

Proteiny, větší než 40 kDa, jsou aktivně transportovány díky přítomnosti jaderných lokalizačních signálů (NLS; z angl. nuclear localization signal), nebo jaderných exportních signálů (NES, z angl. nuclear export signal) v jejich sekvenci. NLS a NES jsou rozeznávány jadernými transportními receptory (NTR; z angl. nuclear transport receptor), které slouží buď k importu do jádra (importiny), nebo exportu z jádra (exportiny). NTR se dále vážou na malou GTPázu Ran, která ve formě Ran-GTP stabilizuje vazbu exportinu a proteinu obsahující NES, a destabilizuje vazbu importinu a proteinu nesoucí NLS. Ran-GDP v cytoplazmě působí opačně. V důsledku tohoto mechanismu se proteiny obsahující NES transportují do cytoplazmy a proteiny obsahující NLS do jádra (Sorokin a kol., 2007).

Po rozpadu jaderné membrány zůstává RCC1 navázán na chromatin, kolem chromozomů je tedy stále vysoká koncentrace Ran-GTP. Se zvyšující se vzdáleností od chromozomů RanGAP a RanBP1/2 hydrolyzují Ran-GTP na Ran-GDP. Tímto mechanismem se ustanovuje gradient aktivního Ran-GTP kolem chromozomů (Cavazza a Vernos, 2016).

Velikost dělicího vřeténka a jeho poloha v myších oocytech je ovlivněna Ran-GTP gradientem a aktivitou MTOC. Ran-GTP se spolu s importinem β účastní nukleace mikrotubulů během výstavby meiotického dělicího vřeténka. Lidské oocyty neobsahují MTOC, výstavba dělicího vřeténka je nejspíše závislá čistě na Ran-GTP (Holubcová a kol., 2015; Drutovic a kol., 2020). Importin β váže faktory potřebné

pro výstavbu dělicího vřeténka (dále také SAF, z angl. Spindle Assembly Factors) nesoucí NLS. Aktivita SAF je vazbou s importinem β inhibována. Po rozpadu jaderné membrány dochází ke tvorbě gradientu Ran-GTP kolem chromozomů, který po vazbě s importinem β uvolňuje jeho navázané SAF (Clarke a Zhang, 2008). Uvolněním z komplexu s importinem β jsou SAF aktivovány, a podílejí se na nukleaci mikrotubulů a dalších procesů výstavby dělicího vřeténka, nejčastěji vazbou s dalšími regulačními proteiny. Jako příklad SAF regulovaných Ran-GTP můžeme uvést TPX2 (z angl. targeting protein for Xklp2), HURP (z angl. hepatoma up-regulated protein) a Numa (Protein jaderného mitotického aparátu, z angl. nuclear mitotic apparatus protein) (Gruss, 2018).

Podobně jako Ran-GTP, signální dráha CPC se účastní v některých buněčných typech nukleace mikrotubulů a následné výstavby dělicího vřeténka. Jedná se o komplex proteinů, z nichž část působí regulačně a zprostředkovává vazbu na různé buněčné komponenty, a část zajišťuje enzymatickou aktivitu komplexu (Carmena a kol., 2012). CPC se váže na centromerickou oblast chromozomu, s postupem dělení se přesouvá na mikrotubuly dělicího vřeténka. Skládá z vnitřního centromerického proteinu (INCENP, z angl. Inner centromeric protein), survivinu, borealinu, Aurora kinázy B (AURKB) u mitotických buněk, a predominantně Aurora kinázou C (AURKC) u myších oocytů. Role CPC ve výstavbě dělicího vřeténka byla prokázána u oocytů *Drosophily* a *Xenopa*, avšak zůstává neobjasněna u savčích oocytů. Snížením exprese genu pro INCENP u oocytů *Drosophily* dojde k opožděné tvorbě dělicího vřeténka, nepřítomnost INCENP nebo AURKB v CPC výstavbě úplně zabrání. Podobně je tomu u oocytů *Xenopa*, kde je INCENP potřebný k výstavbě dělicího vřeténka závislé na chromatinu. To neplatí pro myší oocyty, kde částečné utlumení aktivity INCENP vedlo k tvorbě bipolárního dělicího vřeténka s funkčními MTOC (Balbouda a kol., 2016). Společně s AURKB jsou schopny vzájemně kompenzovat své funkce a tím nejspíš i ztrátu některých komponent CPC. U oocytů *C. elegans* nejspíš CPC není esenciální pro iniciaci výstavby dělicího vřeténka, ale až v průběhu meiózy. Oocyty bez funkčního CPC byly schopny začít meiózu, ale později měly neorganizované dělicí vřeténko. (Colombié a kol., 2008; Wignall a Villeneuve, 2009; Tseng a kol., 2010; Radford a kol., 2017)

1.3 Segregace chromozomů

Segregace chromozomů je stěžejním procesem pro rovnoměrné rozdělení genetické informace. (FitzHarris, 2012). Pro kontrolu správného připojení chromozomů na mikrotubuly dělicího vřeténka má buňka kontrolní mechanismus, tzv. kontrolní bod sestavení dělicího vřeténka (SAC, z angl. Spindle assembly checkpoint). Pokud všechny chromozomy nejsou správně připojeny na mikrotubuly, kinetochory aktivují SAC a následně je inhibován anafázi podporující komplex (APC, z angl. Anaphase-promoting complex). Buňka nemůže pokračovat v dělení, dokud nejsou spojení napravena. Tímto mechanismem se buňka snaží předejít vzniku dceřiných buněk s nadměrným či nedostatečným počtem chromozomů, tedy

aneuploidii (Lara-Gonzalez a kol., 2012). Po opravě chybných spojení kinetochor a mikrotubulů je aktivován APC a buňka pokračuje do anafáze, kdy jsou bivalenty odděleny separázou, která štěpí kohezin pojící homology k sobě (Sanders a Jones, 2018).

Kinetochory sesterských chromatid jsou v tomto případě připojeny k mikrotubulům vycházejících ze stejného pólu dělicího vřeténka, kdežto ke kinetochorám homologních chromozomů se vážou mikrotubuly z opačných pólů (Watanabe, 2012). Aby k oddělení sesterských chromatid nedocházelo předčasně, jsou centromery opatřeny kohezinem specifickým pro meiózu. Ten je během anafáze I chráněn před štěpením separázou, takže sesterské chromatidy drží stále u sebe a jsou odděleny pouze homology. Pokud je koheze mezi sesterskými chromatidami narušená, můžou být od sebe chromatidy odděleny již během anafáze I. Ztráta koheze je jednou z hlavních příčin častých aneuploidií u rodiček vyššího věku (Chiang a kol., 2010).

I přes to, že jsou výstavba dělicího vřeténka a segregace chromozomů přísně regulované procesy, často v nich dochází k chybám. V důsledku chybného meiotického dělení dochází často ke změnám počtu chromozomů, tedy aneuploidiím. Lidské oocyty jsou obzvláště náchylné ke vzniku aneuploidií, kdy přes 20 % všech vajíček má nějakou odchylku od běžného počtu chromozomů (Hassold a Hunt, 2009). Většina těchto odchylek je způsobena právě chybami v segregaci chromozomů v prvním meiotickém dělení a jsou hlavními příčinami neplodnosti, potratů a vzniku vrozených vad u lidí. Jednou z nejčastějších vrozených vad vzniklých v důsledku aneuploidie je Downův syndrom (Nagaoka a kol., 2012).

2 Proteinkinázy regulující buněčné dělení

Proteinkinázy jsou enzymy třídy transferáz, které katalyzují fosforylaci, tedy přenos fosfátu z donorové molekuly (tzn. molekuly, která poskytuje svoji fosfátovou skupinu) na akceptor (tzn. molekulu, která přijímá fosfátovou skupinu). Donorem fosfátu je většinou nukleosidtrifosfát, nejčastěji pak adenosintrifosfát, ale mohou jím být i jiné molekuly. Akceptorem fosfátové skupiny je aminokyselina substrátového proteinu. Proteinkinázy se dále dělí do pěti základních skupin podle akceptorové aminokyseliny, na kterou dané proteinkinázy specificky navazují fosfátovou skupinu:

- Serin/threoninové proteinkinázy
- Tyrosinové proteinkinázy
- Histidinové proteinkinázy
- Cysteinové proteinkinázy
- Aspartátkinázy a glutamátkinázy

(Hunter, 1991)

Poslední tři skupiny proteinkináz jsou specifické spíše pro prokaryota, kdežto serin/threoninové a tyrosinové proteinkinázy jsou významnými regulátory mnoha procesů v eukaryotických buňkách, jedním z nichž je buněčný cyklus (Hanks a Hunter, 1995).

Účast proteinkináz na regulaci buněčného dělení byla z velké části prozkoumána zejména u mitózy. Mezi nejvýznamnější mitotické proteinkinázy patří cyklin dependentní-kinázy (CDK), Aurora kinázy (AURK), Polo-like kinázy (PLK) a NIMA (z angl. Never in mitosis in *Aspergillus nidulans*) příbuzné kinázy (NEK, z angl. NIMA-related kinases), jako je Haspin kináza. Tyto kinázy se účastní nejen samotného dělení, ale také vstupu do M fáze a jejího ukončení (Ma a Poon, 2011).

Cyklin dependentní kinázy jsou významnými regulátory průběhu mitózy. CDK v komplexu se svými regulačními podjednotkami řídí průběh buněčného cyklu a přechod mezi jednotlivými fázemi. Nejdůležitějšími CDK u savčích buněk jsou CDK1, 2, 4 a 6. CDK patří mezi serin/threoninové kinázy a jsou regulované svými vazebnými partnery cykliny, jejichž koncentrace se během buněčného cyklu opakovaně zvyšuje a snižuje, a poskytují CDK domény potřebné k jejich enzymatické aktivitě. K aktivaci dochází pomocí CDK aktivační kinázy fosforylací threoninu v T smyčce CDK. Mezi nejhojněji se vyskytující cykliny patří cykliny typu A a typu B, jejichž hladina stoupá s nástupem S fáze, G2 a časné M fáze, a v komplexu s CDK1 navozují vstup do mitózy (Malumbres, 2014).

Vytvoření stabilní vazby kinetochoru a mikrotubulů závisí na hladině CDK1 (Davydenko a kol., 2013). Aktivita CDK1 ovlivňuje další proteiny a kinázy. Při snížené fosforylační aktivitě CDK1 fosforylační aktivita AURKB a AURKC negativně ovlivňuje stabilitu vazby kinetochoru a mikrotubulů, s jejím zvyšováním jsou pak rekrutovány určité fosfatázy, které vazbu naopak stabilizují. Pokud se aktivita

CDK1 zvýší příliš brzy v buněčném dělení, dojde k předčasnému vytvoření těchto stabilních vazeb (Yoshida a kol., 2015).

CDK1 zastává v meióze podobné funkce, jako v mitóze. Reguluje přechod mezi fázemi buněčného cyklu i samotné meiózy, včetně vstupu do M fáze. Avšak kvůli zastavení meiózy v profázi I u oocytů je v této fázi nutné snížení aktivity CDK1. To je dosaženo pomocí protein kináz MYT1 (Myelinový transkripční faktor, z angl. myelin transcription factor 1) a WEE1 (z angl. western equine encephalitis), které narušují stabilitu vazby CDK1 na donorový fosfát a tím pádem i snižují její schopnost fosforylovat substrát (Schindler, 2011).

Během mitózy se také uplatňují dvě AURK– Aurora kináza A (AURKA) a Aurora kináza B (AURKB). Oproti somatickým buňkám, které exprimují pouze AURKA a AURKB, gamety navíc k těmto dvěma proteinkinázám exprimují ještě třetí – AURKC, která je specifická právě pro meiózu. Proč gamety exprimují tři Aurora kinázy a jak tyhle kinázy kooperují v meióze není známo. (Quartuccio a Schindler, 2015).

S Aurora kinázami úzce souvisí aktivita jedné z NEK, konkrétně Haspin kinázy. Ta fosforyluje threonin na histonu H3 v oblasti centromer a podporuje vazbu AURKB v této oblasti během mitózy (Broad a kol., 2020). V meióze se Haspin kináza účastní výstavby bipolárního dělicího vřeténka skrze regulaci umístění a aktivity AURKC na MTOC (Balboula a kol., 2016).

Další skupinou regulačních proteinkináz jsou v mitóze PLK. PLK2 a PLK3 regulují hlavně buněčný cyklus, kde PLK2 řídí přechod z G1 fáze do S fáze a PLK3 je součástí signálních drah reagujících na stresové podněty (Ma a Poon, 2011). V samotné mitóze jsou nejdůležitějšími polo-like kinázami PLK1 a PLK4. (Kumar a kol., 2016; Moyer a Holland, 2019).

V této práci se zaměřím na Aurora kinázy a Polo-like kinázy, u kterých byly pozorovány aktivity esenciální pro správné rozdělení chromozomů během asymetrického dělení savčích oocytů. Shrnutí jejich aktivit v mitóze je popsáno v tab. 1.

Tab. 1 Shrnutí funkcí regulačních proteinkináz v mitóze

Název	Funkce
CDK1	Katalytická podjednotka MPF (maturaci podporující faktor, z angl. maturation-promoting factor), cyklin A2 – CDK1 komplex reguluje mitózu (G2 fáze)
CDK2	Cyklin A2 – CDK2 komplex reguluje mitózu (S fáze)
PLK1	Zrání centrozomů, výstavba dělicího vřeténka, segregace chromozomů, cytokineze, oprava poškození DNA
PLK3	Signální dráhy odpovědi na stres, oprava poškození DNA
AURKA	Centrozomální funkce
AURKB	Výstavba dělicího vřeténka, cytokineze, lokalizace v CPC
Haspin	Aktivace AURKB

(Ma a Poon, 2011, převzato a upraveno)

2.1 Aurora kinázy

Aurora kinázy (AURK) patří mezi serin/threoninové kinázy, které svojí aktivitou ovlivňují buněčné dělení (Radford a kol., 2017). Savčí buňky kódují tři známé AURK, z toho většina somatických buněk exprimují dvě – Aurora kinázu A (AURKA) a Aurora kinázu B. Aurora kináza C je ve většině somatických buněk exprimována pouze v malém množství, nebo je exprese úplně potlačena. Aktivní formu AURKC můžeme pozorovat v savcích spermiích a oocytech (až po raný embryonální vývoj), a její exprese je zvýšena i v nádorových buňkách rakoviny prsu, děložního čípku či jater (Kimura a kol., 1999; Tang a kol., 2006; Quartuccio a Schindler, 2015; Sasai a kol., 2016).

Tyto tři kinázy se významně účastí výstavby dělicího vřeténka, zarovnání chromozomů do metafázní roviny, jejich segregaci a další důležitých procesů buněčného dělení (Kimura a kol., 1999; Carmena a Earnshaw, 2003).

Aurora kinázy jsou regulovány na mnoha úrovních. K jejich aktivaci dochází autofosforylací threoninu v T smyčce (telomerické smyčce). K regulaci jejich množství a aktivity v buňce dochází též na transkripční úrovni. Exprese proteinů je závislá na množství odpovídající mRNA, což závisí na míře transkripce dané mRNA. Ta se v průběhu buněčného cyklu mění a s ní i množství produktů translace. Například transkripce *Aurka* mRNA dosahuje maxima na přechodu G2 a M fáze, maximální exprese následuje krátce poté. Kromě aktivace AURK je i jejich degradace vysoce regulovaná. Všechny tři AURK obsahují tzv. D-boxy (destrukční box, sekvence potřebná pro destrukci proteinu ubiquitinací), které jsou rozpoznávány APC/C komplexem (Anafázi podporující komplex/cyklozom, z angl. anaphase-promoting complex/cyclosome) (Littlepage a kol., 2002; Kimura a kol., 2004; Goldenson a Crispino, 2015). APC/C

je ubikvitin ligáza, která reguluje progresi buněčným cyklem zprostředkovanou degradací jiných regulátorů buněčného cyklu (Alfieri a kol., 2017).

Tab. 2 Shrnutí charakteristik Aurora kináz v meióze

Aurora kináza	Vazebný partner	Lokalizace	Funkce
AURKA	TPX2, Bora	Póly dělicího vřeténka	Organizace dělicího vřeténka, oprava vazby kinetochor a mikrotubulů
AURKB	Neznáme	Mikrotubuly	Seřazení chromozomů do metafázní roviny
AURKC	INCENP	Póly dělicího vřeténka, centromery/ vnitřní osa chromatid	Shlukování MTOC, řazení chromozomů do metafázní roviny, kondenzace chromozomů, oprava vazby kinetochor a mikrotubulů

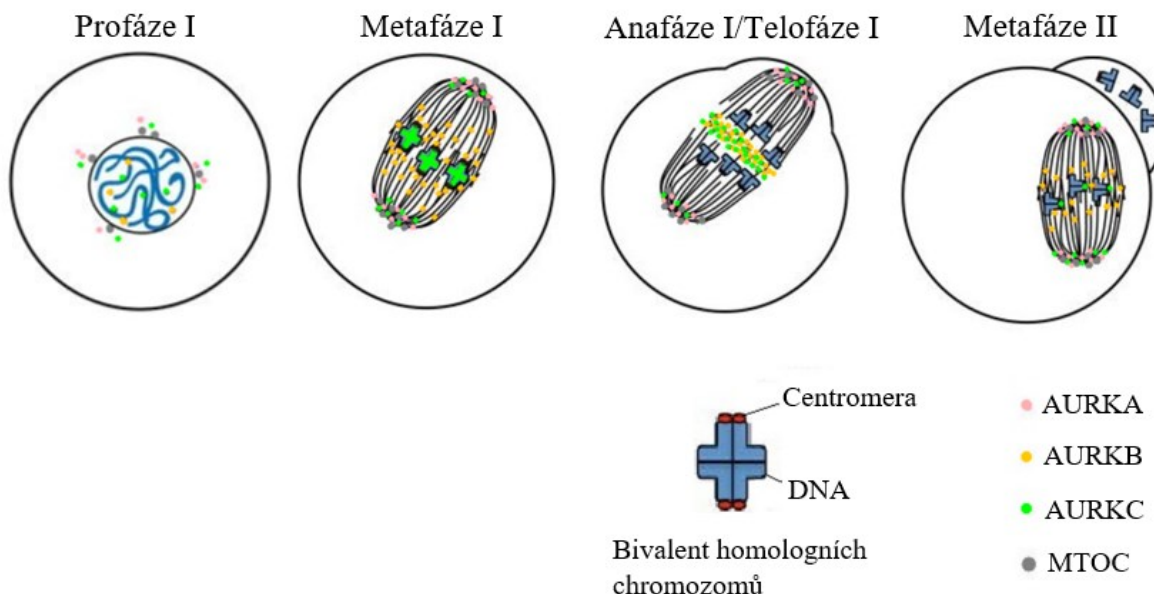
(Nguyen a Schindler, 2017, převzato a upraveno)

Role AURK jsou daleko lépe prozkoumané v mitóze, které se AURKA a AURKB účastní jako jedny z předních regulačních mechanismů. AURKA je asociována s centrozomy na pólech mitotického dělicího vřeténka, reguluje maturaci centrozomů, polymeraci centrozomálních mikrotubulů a podporuje výstavbu bipolárního dělicího vřeténka (Barr a Gergely, 2007; Magnaghi-Jaulin a kol., 2019). AURKB je součástí komplexu CPC a podílí se na kondenzaci chromozomů, jejich seřazení do metafázní roviny, zajištění správného připojení mikrotubulů na kinetochory a cytokinezi (Carmena a kol., 2012). Aktivita AURKA nejspíše podléhá asociaci s TPX2 a degraduje se prostřednictvím APC/C, zatímco AURKB je svým umístěním i aktivitou závislá na vazbě s komplexem CPC (Carmena a Earnshaw, 2003; Nguyen a Schindler, 2017).

I během meiózy mají Aurora kinázy své specifické vazebné partnery, funkce i umístění. Jejich funkce se vzájemně doplňují, některé se však překrývají. Tyto charakteristiky jsou shrnuty v tab. 2, dynamické změny lokalizace AURK během meiózy jsou znázorněny na obr. 6.

2.1.1 Aurora kináza A

Role AURKA je v mitóze dobře prozkoumána. Její lokalizace se v průběhu mitózy dynamicky mění, přičemž se lokalizuje na duplikované centrioly a póly dělicího vřeténka. Její umístění na centrozomy závisí u obratlovců na přítomnosti proteinu CEP192 na centriolách, v G2 fázi buněčného cyklu pak napomáhá navázání PCM do centrozomu v procesu, který se nazývá zrání centrozomu. Po dozrání centrozomu AURKA reguluje polymeraci mikrotubulů a tím zajišťuje vznik bipolárního dělicího vřeténka (Joukov a kol., 2010; Magnaghi-Jaulin a kol., 2019).



Obr. 6 Změny lokalizace Aurora kináz v meióze oocyty (Nguyen a Schindler, 2017, převzato a upraveno)

Po začátku výstavby dělicího vřeténka se AURKA přemísťuje na mikrotubuly a póly dělicího vřeténka. Oproti centrozomálně umístěné AURKA, polární AURKA je aktivována proteinem TPX2. Tento mikrotubuly vázající protein se během interfáze váže na importiny α a β , proto se nachází v jádře. Nadměrná exprese TPX2 a následně zvýšená exprese a aktivita AURKA během mitózy způsobují aneuploidie, které jsou u somatických buněk spojovány se vznikem nádorů (Holland a Cleveland, 2009).

Po rozpadu jaderné membrány však dochází k tvorbě Ran-GTP gradientu kolem chromozomů a uvolnění TPX2 z vazby na importin. Volný TPX2 se váže na mikrotubuly, reguluje výstavbu dělicího vřeténka, je schopen aktivovat AURKA a lokalizovat ji na mikrotubuly dělicího vřeténka, během jejich vazby také zabráňuje defosforylaci AURKA (Carazo-Salas a kol., 2001; Kufer a kol., 2002; Bayliss a kol., 2003). Aktivní AURKA se pak podílí na fosforylaci centrozomálního proteinu TACC3 (z angl. Transforming Acidic Coiled-Coil protein) a tím i na nukleaci mikrotubulů a vznik mitotického dělicího vřeténka (Brittle a Ohkura, 2005).

Aurora kináza A se během meiotické metafáze I a II nachází na pólech dělicího vřeténka, kde se může nejlépe účastnit jeho organizace (Carmena a Earnshaw, 2003). AURKA se podílí na lokalizaci γ -tubulinu a pericentrinu na MTOC, které se bez těchto složek nedokážou správně shlukovat na pólech dělicího vřeténka. Následkem toho se dělicí vřeténko často úplně rozpadá (Bury a kol., 2017). I přes to, že snížení hladiny AURKA vede k výstavbě defektivního dělicího vřeténka či jeho úplnému rozpadu,

nadměrná exprese této kinázy má také negativní účinky. Při snížení hladiny AURKA v buňce nedochází k vytvoření bipolárního dělicího vřeténka a při nadměrné expresi vznikají abnormálně dlouhé mikrotubuly dělicího vřeténka a znásobují se MTOC. Množství AURKA v buňce musí být tedy striktně regulováno (Nguyen a Schindler, 2017).

Dvěma důležitými vazebnými partnery této kinázy v meióze jsou TPX2 a Bora (z angl. protein aurora borealis). TPX2 se v oocyту exprimuje s nástupem meiózy I až po její zastavení v metafázi II. Je potřeba pro acentrozomální výstavbu dělicího vřeténka u myších oocytů, váže a aktivuje AURKA, a podílí se na fosforylaci TACC3 na MTOC, čímž reguluje integritu pólu dělicího vřeténka (Brunet a kol., 2008). TPX2 má také význam pro správný průběh meiotického dělení během raného embryonálního vývoje (Aguirre-Portolés a kol., 2012).

Protein Bora je zodpovědný za aktivaci AURKA a schopnost této kinázy fosforylovat další kinázy, zejména PLK1. Bora během výstavby dělicího vřeténka určuje lokalizaci AURKA. Pokud protein Bora není aktivní nebo přítomný v buňce, AURKA se není schopna správně rozmístit po dělicím vřeténku. Důsledkem toho jsou chyby ve výstavbě dělicího vřeténka a chybné seřazení chromozomů do metafázní roviny (Zhai a kol., 2013).

V roce 2018 Nguyen a kol. popsali nové specifické role AURKA. Studie odhalila, že v myších oocytech je AURKA schopna kompenzovat ztrátu AURKB i AURKC. *Aurkb* cKO (z angl. conditional knock-out; kondicionální knock-out; delece *Aurkb* v oocytech) i *Aurkc* KO (knock-out; delece *Aurkc*) myši samice měly sníženou fertilitu, avšak nebyly infertilní. Testování fertility u *Aurkb* cKO/ *Aurkc* KO (myš s delecí *Aurkb* v oocytech a *Aurkc* ve všech buňkách) myších samic opět prokázalo překvapivě jenom sníženou fertilitu, a ne infertilitu. U oocytů izolovaných z *Aurkb* cKO/ *Aurkc* KO myši byla pomocí metody Western blot pozorována zvýšená fosforylace AURKA oproti wild-type (WT) oocytům. Pomocí třibarevné konfokální mikroskopie živých oocytů bylo pozorováno, že u oocytů z *Aurkb* cKO/ *Aurkc* KO myši je samotná AURKA schopna podpořit průběh meiózy. U těchto oocytů byla pozorována výstavba bipolárního dělicího vřeténka a u většiny došlo k normální segregaci chromozomů (Nguyen a kol., 2018).

Nedávné studie naznačují, že AURKA má významnou roli při tvorbě a udržení LISD. V souvislosti s funkcí LISD byla prozkoumána role polo-like kinázy 1 (PLK1), polo-like kinázy 4 (PLK4) a AURKA ve tvorbě a udržení domény. Jedině farmakologická inhibice AURKA vedla k narušení LISD a následnému vzniku defektních dělicích vřetének. Z poznatků So a kol. vyplývá, že aktivita AURKA je nezbytná pro vznik meiotické LISD a následný vznik funkčního bipolárního dělicího vřeténka u savčích oocytů. Vznik LISD je závislý na vazebném partnerovi AURKA - TACC3, který spolu s těžkým klathrinovým řetězcem CHC17 (z angl. clathrin heavy chain 17) váže mikrotubuly (So a kol., 2019).

2.1.2 Aurora kináza B

Během mitotického dělení je AURKB v komplexu s INCENP a survivinem součástí CPC, čímž je dána její nezbytnost v regulaci připojení kinetochor na mikrotubuly, koheze sesterských chromatid a cytokineze. AURKB se u mitotických buněk nejprve se nachází na chromozomech, v pozdějších fázích mitózy se s CPC přesouvá na mikrotubuly dělicího vřeténka (Adams a kol., 2001). Aktivita i umístění AURKB je regulována skrze její interakce se složkami CPC, jako je INCENP, borealin a survivin (Jeyaparakash a kol., 2007; Sasai a kol., 2016).

Zatímco AURKB je dominantní kinázou ve spojení s CPC v mitóze, v meióze ji nahrazuje AURKC a AURKB se během metafáze I i II nachází převážně na mikrotubulech dělicího vřeténka. Jak AURKB, tak AURKC se vážou na IN box oblast proteinu INCENP a fosforylují ho, ale nejsou toho schopny obě naráz (Chen a kol., 2005; Balboula a Schindler, 2014).

Specifická role AURKB v oocytech je stále nejasná, ale má funkci v regulaci řazení chromozomů do metafázní roviny. To dokazuje práce Shuda a kol. (2009), kdy byly WT oocyty inkubovány s inhibitorem ZM447439, který inhibuje zároveň AURKB a AURKC. Inkubace oocytů s tímto inhibitorem vedlo k signifikantnímu nárůstu počtu oocytů, které vykazovali nesprávné seřazení chromozomů v metafázi I i metafázi II. Pouze nadměrná exprese AURKB z mikroinjekované mRNA, a ne nadměrná exprese AURKC, vedla v ZM447439-inkubovaných oocytech k poklesu počtu oocytů, které vykazovaly nesprávné seřazení chromozomů v metafázi I i metafázi II (Shuda a kol., 2009).

AURKB a AURKC mají podobnou strukturu, sekvenci, katalytickou aktivitu a vazebné partnery, kvůli čemuž je těžké přesně od sebe jejich funkce oddělit. Je však jasné, že jsou schopny se navzájem kompenzovat, pokud dojde ke ztrátě jedné z nich. Delece AURKC u myších oocytů vede k signifikantnímu nárůstu počtu oocytů zastavených v metafázi I, ale zhruba polovina těchto oocytů je schopna dojít do metafáze II a vyloučit první pólové tělísko. Je to díky kompenzaci funkce AURKC Aurora kinázou A a B v *Aurkc* KO oocytech, kde se tyto dvě kinázy lokalizují i na centromery a kinetochory, a následně fosforylují INCENP, což v oocytech predominantně zajišťuje AURKC (Schindler a kol., 2012; Balboula a Schindler, 2014; Nguyen a Schindler, 2017).

Když byly porovnány WT oocyty a oocyty izolované z *Aurkb* cKO a *Aurkc* KO myši, bylo zjištěno, že mnohem více oocytů v metafázi II z *Aurkb* cKO myši bylo aneuploidní a vykazovaly známky předčasně separovaných sesterských chromatid. V těchto oocytech byla v nadměrné míře aktivní AURKC, což ale vedlo ke snížení kvality oocytů a častějšímu výskytu aneuploidii. Pokud byla do těchto oocytů přidána zpětně AURKB, oocyty byly částečně zachráněny a výskyt aneuploidii byl opět snížen. Tyto výsledky naznačují na specifickou funkci AURKB, nejspíše negativní regulaci aktivity AURKC a tím zajištění správné segregace chromozomů a následné separace sesterských chromatid (Nguyen a kol., 2018).

2.1.3 Aurora kináza C

Oproti AURKA a AURKB, AURKC je nejvíce exprimována v gametách. Během meiózy přebírá mnoho funkcí, které v mitóze zastává AURKB. Funguje v komplexu s CPC, jako jeho katalytická podjednotka. Zastává zde mimo jiné funkci hlavního regulátoru segregace chromozomů (Li a kol., 2004; Balboula a Schindler, 2014).

Umístění této kinázy s CPC ovlivňuje kináza Haspin. Společně s CPC je kináza aktivní obzvláště na chromozomech, specificky na vnitřní ose chromatid (ICA, z angl. inner chromatid axis). V těchto místech se AURKC účastní tvorby a opravy stabilních vazeb kinetochor na mikrotubuly. Pokud dojde ke ztrátě funkce Haspin kinázy v oocytech, komplex CPC a AURKC není přítomen na ICA, avšak zůstává na kinetochorech. V důsledku toho vzniká daleko více stabilních, ale chybně utvořených vazeb kinetochor na mikrotubuly (Nguyen a kol., 2014). Mimo umístění na ICA, Haspin reguluje aktivitu AURKC i na druhém známém místě jejího účinku – na pólech dělicího vřeténka. V těchto místech je AURKC potřebná pro správné shlukování a stabilitu MTOC center. Inhibice Haspin kinázy v myších oocytech vede k defektům ve shlukování MTOC v metafázi I a anafázi I, a jenom nadměrná exprese AURKC z mikroinjekované mRNA, ale ne nadměrná exprese AURKA a AURKB, je schopna snížit procentuální zastoupení oocyty s defektem MTOC center. Také exprese dominantně negativní alely *Aurkc* vede k chybnému shlukování MTOC a oocyty zůstávají díky aktivitě SAC zastaveny v metafázi I. To potvrzuje předpokládaný význam aktivity AURKC na pólech dělicího vřeténka (Balboula a kol., 2016; Nguyen a kol., 2018).

Nedávno bylo popsáno, že AURKC „soupeří“ s AURKA o umístění na chromozomech. Je-li přítomna AURKC v myších oocytech, AURKA zůstává lokalizována pouze na pólech dělicího vřeténka. V *Aurkc* KO a *Aurkb* cKO/Aurkc KO oocytech je možné pozorovat aktivitu AURKA jak na pólech, tak na chromozomech. Pouze v oocytech, které exprimují AURKC, je AURKA lokalizována výhradně na póly dělicího vřeténka. Regulace umístění AURKA pomocí AURKC hraje významnou roli v meióze savčích oocytů (Nguyen a kol., 2018).

V roce 2017 byly popsány mutantní varianty AURKC a AURKB v meióze. Mutantní AURKC (*Aurkc* c.144delC; delece jednoho nukleotidu) byly již dříve popsány v samčí meióze jako škodlivé a vedoucí k aneuploidiím. Samičí nositelky této mutace byly fertlní, což naznačuje pohlavně specifickou nevýhodu této mutace. Na savčích oocytech nebyly pozorovány žádné defekty vyvolané touto variantou AURKC (Dieterich a kol., 2007, 2009). Mutantní varianta AURKB se záměnou jedné aminokyseliny (Leucine 39 na Prolin) se projevuje pozitivně v řazení chromozomů do metafázní roviny i u oocytů, které vykazovaly významné defekty v tomto procesu. Změna jedné aminokyseliny na N-konci AURKB vede ke zvýšení aktivit, které chrání euploidii u myších oocytů (Nguyen a kol., 2017).

2.2 Polo-like kinázy

Podobně jako Aurora kinázy, Polo-like kinázy (PLK) jsou serin/treoninové kinázy s charakteristickou polo-box doménou, od které získaly své jméno. Tato doména zvyšuje substrátovou specifitu a umožňuje polo-like kinázám zvýšit specifitu vazby na určité buněčné struktury během buněčného dělení. Obdobně jako u AURK je jejich význam při regulaci buněčného dělení potvrzen tím, že zvýšená aktivita je spojována se vznikem nemocí jako jsou nádorová onemocnění (Vaid a kol., 2016). Buňky obratlovců exprimují celkem pět PLK, přičemž PLK1, PLK2, PLK3 a PLK4 se účastní regulace buněčného cyklu a samotného dělení, zatímco PLK5 je spojena s odpověďmi na poškození DNA (Andrysik a kol., 2010).

Co se týče mitózy, PLK1 můžeme skrze buněčný cyklus najít na mnoha buněčných strukturách a ovlivňující mnoho procesů, kdežto ostatní PLK jsou specifitěji vázány na určité buněčné struktury, a dokonce i fáze buněčného cyklu. PLK1 se nejprve během G2 fáze přemísťuje na centrozomy, kde reguluje zrání centrozomů, aktivaci CDK a vstup do mitózy. Na počátku mitózy PLK1 podporuje aktivaci AURKB, Haspin kinázy a kinázy BUB1 (z angl. Budding uninhibited by benzimidazoles 1). Společně tyto kinázy vážou CPC do oblasti centromer. Později v prometafázi a metafázi mění svoji lokalizaci na kinetochory a póly dělicího vřeténka, kde se účastní regulace připojení mikrotubulů na kinetochory. Následně v anafázi a telofázi se přemísťuje na mikrotubuly dělicího vřeténka, kde funguje jako regulátor SAC, prodloužení dělicího vřeténka a funkce APC/C. V telofázi navíc svou aktivitou přispívá k zaškrcení buňky a následně i cytokinezi (Zitouni a kol., 2014; Combes a kol., 2017).

Oproti PLK1 se ostatní PLK nepohybují během buněčného cyklu tak dynamicky a nejsou tak důležitými aktéry v samotné mitóze. K expresi PLK2 dochází hlavně v G1 fázi, kdy reguluje duplikaci centriol a následný přechod z G1 do S fáze. PLK3 je exprimována konstantně během celého buněčného cyklu, je zapojena v replikaci DNA v G1 fázi, přechodu z G1 do S fáze a z G2 do M fáze a v neposlední řadě i v cytokinezi. PLK4 pak během G1 fáze reguluje výstavbu a duplikaci centriol, a má zásadní roli pro vznik vitálních buněk, avšak přesné mechanismy jejího účinku nejsou známy (Ma a Poon, 2011; Zitouni a kol., 2014).

U obratlovců najdeme mnoho různých PLK, ale v kontextu savčích oocytů jsou nejvýznamnější a nejprozkoumanější PLK1 a PLK4. Tyto kinázy jsou v meióze spojovány obzvláště s obnovením meiotického dělení po jeho zastavení v profázi I, ale i v dalších fázích zrání oocyty (Luo a Kim, 2015; Solc a kol., 2015).

2.2.1 Polo-like kináza 1

Role PLK1 v mitóze je velmi dobře popsána. PLK1 regulací jiných kináz a fosfatáz ovlivňuje zrání centrozomů, podporuje vstup do mitózy a napomáhá vzniku bipolárního dělicího vřeténka (Barr a kol.,

2004). PLK1 se uvnitř buňky dynamicky pohybuje a místo svého působení reguluje sama. V této regulaci sebe sama nejspíše hraje roli polo-box doména typická pro tuto rodinu kináz (Petronczki a kol., 2008).

PLK1 podléhá během své existence v buňce několika posttranslačním úpravám, jako je fosforylace, která PLK1 aktivuje, či ubikvitinace, která vede většinou k degradaci PLK1. PLK1 také podléhá posttranslační úpravě SUMOylaci, kterou je na protein navázána molekula SUMO (Malý modifikační protein podobný ubikvitinu, z angl. Small ubiquitin-like modifier), což i přes podobnost mechanismu s ubikvitinací nevede k degradaci proteinu. Obratlovci exprimují čtyři formy SUMO, 1 až 4. V roce 2018 Feitosa a kol. publikovali výsledky studie, která spojuje molekuly SUMO-1 a SUMO-2/3 a PLK1 v myších oocytech. Autoři popsali, jak SUMOylace reguluje aktivitu PLK1 v myších oocytech a je důležitá pro správnou výstavbu dělicího vřeténka oocyty. SUMO-1 reguluje aktivitu a lokalizaci PLK1 na dělicím vřeténku a jeho pólech, kdežto SUMO-2/3 reguluje aktivitu PLK1 na kinetochorách a je nezávislá na dělicím vřeténku. (Feitosa a kol., 2018)

PLK1 hraje i v meióze důležitou roli, obzvláště po zastavení oocyty v profázi I a následném znovuzahájení meiózy. Svojí aktivitou podporuje NEBD (rozpad jaderné membrány, z angl. Nuclear envelope breakdown) a lokalizuje centrozomální proteiny, jako je γ -tubulin a pericentrin, na MTOC. Znovuzahájení meiózy a NEBD jsou závislé na aktivitě CDK1, již reguluje právě PLK1. Dále se v myších oocytech účastní kondenzace chromozomů, napojení mikrotubulů na kinetochory, segregace chromozomů a cytokineze (Solc a kol., 2015).

Prvním morfologickým znakem znovuzahájení meiózy je rozpad jaderné membrány. Jedním ze zásadních kroků pro NEBD, je dočasný rozpad jaderných pórů. PLK1 se v lidských meiotických buňkách v pozdní profázi I nachází na periférii jaderné membrány a asociuje s NPC (Jaderné póry, z angl. nuclear pore complex), které následně fosforyluje a tím spouští NEBD. Inhibice PLK1 sice vede k opožděnému NEBD, avšak v porovnání s inhibicí CDK1 je vzniklé zpoždění minimální. PLK1 se účastní regulace včasného nástupu NEBD, avšak nehraje esenciální roli (de Castro a kol., 2018; Little a Jordan, 2020). PLK1 zastává v NEBD nejspíše specifickou roli u oocytů, kdy zajišťuje, aby rozrušení a následný rozpad jaderné membrány předcházely kondenzaci chromozomů. Ke kondenzaci chromozomů přispívá vazbou na kondenzin II, jehož aktivitu stimuluje fosforylací jeho podjednotek (Abe a kol., 2011; Solc a kol., 2015).

Podobně jako u myších oocytů, i u prasečích oocytů byl prokázán význam PLK1 v meióze. PLK1 je esenciální pro správný průběh prvního meiotického dělení, ovlivňuje organizaci dělicího vřeténka a řazení chromozomů do metafázní roviny. Po specifické inhibici PLK1 inhibitorem GSK461364 došlo k zastavení většiny oocytů ve fázi GVBD. Byly v nich též pozorovány abnormální dělicí vřeténka a chybně seřazené chromozomy, tyto oocyty nebyly schopny ani vyloučit první pólové tělísko (Liao a kol., 2018).

U mitotických centrozomů přispívá PLK1 svojí aktivitou k jejich separaci, konkrétně disociací proteinu C-NAP1 (Centrozomální protein asociovaný s Nek2, z angl. centrosomal Nek2-associated Protein 1), který v centrozomu spojuje centrioly. Podobně působí i u acentrozomálních MTOC v meióze. Po znovuzahájení meiózy před rozpadem jaderné membrány je dekonenzace a následné shlukování MTOC na pólech závislé na aktivitě PLK1. Pro fragmentaci MTOC je totiž ihned po znovuzahájení meiózy nutná disociace C-NAP1, kterou zprostředkovává svojí aktivitou PLK1 (Clift a Schuh, 2015).

Během NEBD jsou MTOC molekulárním motorem dyneinem roztažena a po úplném rozpadu jaderné membrány se aktivitou kinezinu-5 fragmentují na mnohočetné MTOC (Luksza a kol., 2013; Clift a Schuh, 2015).

Po GVBD PLK1 lokalizuje centrozomální proteiny do acentriolárních MTOC, čímž podporuje vznik bipolárního dělicího vřeténka (Solc a kol., 2015). Pokud je PLK1 kináza (na které je závislá prvotní dekonenzace a fragmentace) inhibována, MTOC zůstávají ve formě multipolární kulovité struktury, jako je tomu v interfázi. Když je inhibována Haspin kináza, MTOC mají problém soustředit svoje umístění pouze na póly dělicího vřeténka. Následkem inhibice Haspin kinázy také dochází ke špatnému zarovnání chromozomů do metafázní roviny a v důsledku toho i chybné segregaci chromozomů (Nguyen a kol., 2014; Clift a Schuh, 2015; Balbouda a kol., 2016).

2.2.2 Polo-like kináza 4

PLK4 je důležitým regulátorem duplikace centriol a je esenciální pro průběh mitózy, hladina její exprese a následná aktivita musí být přísně regulované. V důsledku poklesu hladiny PLK4 nedochází k duplikaci centriol, čímž je narušen buněčný cyklus i proliferace, naopak nadměrnou expresí PLK4 dochází k nadměrnému zmnožení centriol a následně narušení výstavby dělicího vřeténka (Habedanck a kol., 2005).

Tato proteinkináza je součástí MTOC u myších oocytů a raných embryí, u kterých se výstavbě dělicího vřeténka více podobá meióze jak mitóze. Účastní se regulace nukleace mikrotubulů, tím napomáhá vzniku dělicího vřeténka, bez přítomnosti centrozomu. Pokud dojde k vyčerpání mateřské PLK4, dojde k vytvoření defektního dělicího vřeténka s pouze jedním pólem. Později u myších embryí je také součástí mechanismů duplikujících centrioly (Coelho a kol., 2013).

V oocytech se, podobně jako PLK1, podílí na znovuzahájení meiózy po jejím zastavení v profázi I. K maximální expresi PLK4 dochází během GVBD a její pokles vede k zastavení meiózy v GV stádiu. Během dělení se lokalizuje na MTOC, stimuluje nukleaci mikrotubulů a vytvoření bipolárního dělicího vřeténka. Narozdíl od myších embryí, kdy je PLK4 pro výstavbu dělicího vřeténka v raných stádiích esenciální, u myších oocytů nakonec došlo i přes inhibici PLK4 k výstavbě bipolárního dělicího vřeténka. Ani nadměrná exprese PLK4 nijak negativně neovlivňuje výstavbu dělicího vřeténka, či vyloučení prvního

pólového tělíska. PLK4 je pravděpodobně esenciální pro znovuzahájení meiózy, avšak není nezbytná pro výstavbu dělicího vřeténka u savčích oocytů (Luo a Kim, 2015; Bury a kol., 2017).

V kravských oocytech hraje PLK4 důležitou roli během maturace oocyty a následně v raných embryonálních stádiích. Pomocí RNAi (RNA interference; nekódující molekula RNA se váže na specifickou mRNA a brání její expresi) byl proveden knockdown PLK4 v GV stádiu oocyty, který vedl k defektům při výstavbě dělicího vřeténka a chybnému seřazení chromozomů do metafázní roviny. Z těchto výsledků autoři došli k závěru, že PLK4 je u prasečích oocytů esenciální pro průběh meiózy (Liang a kol., 2016).

2.3 Kooperace Aurora kináz a Polo-like kináz

Všechny zmíněné Aurora kinázy a Polo-like kinázy jsou důležitými součástmi buněčného dělení. Každá z těchto proteinkináz zastává sama o sobě významné funkce, některé z těchto funkcí se dokonce překrývají a proteinkinázy spolu kooperují při meióze savčích oocytů.

Jednou ze popsaných kooperací je kaskáda AURKA a PLK1 v mitóze. Signalizace AURKA-PLK1 je vázána na podpůrné vazebné partnery PLK1 a AURKA, konkrétně Bora, CEP192, TPX2 a INCENP. Bora, CEP192 a TPX2 mezi sebou nejspíše vytváří kompetici o vazbu AURKA. Navíc CEP192 a TPX2 spolupracují na místě specifickém omezení aktivity PLK1 a AURKA, čímž je zajištěna optimální aktivita obou proteinkináz a tím ideální průběh mitózy (Joukov a De Nicolo, 2018).

AURKA a PLK1 jsou hlavními regulátory zrání centrozomů, nejsou však vázány přímo na centrozomech. Tvoří komplex s centrozomálním proteinem CEP192, který je naopak vázán přímo na centrozomy. Nahromaděním vysoké koncentrace CEP192 na centrozomech dochází k aktivaci AURKA, která následně fosforyluje PLK1. Aktivní komplex AURKA a PLK1 na CEP192 je schopen poskytnout γ -tubulin, který stojí za nukleací mikrotubulů a tímto mechanismem se zmíněné kinázy účastní výstavby mitotického dělicího vřeténka. AURKA i PLK1 jsou také esenciální pro správný průběh meiózy, konkrétně regulaci sestavení MTOC a vytvoření bipolárního dělicího vřeténka. PLK1 fosforyluje protein CIP2A (buněčný inhibitor PP2A, z angl. cellular inhibitor of PP2A), který se následně lokalizuje do MTOC. CIP2A asociuje s CEP192 a v meióze funguje jako jakési lešení pro CEP192 a je nejspíše zodpovědný za tvorbu komplexu AURKA a PLK1, jejich lokalizaci a aktivaci v meióze (Joukov a kol., 2014; Solc a kol., 2015; Wang a kol., 2018).

Dalším procesem, který AURKA-PLK1 společně regulují, je včasný vstup do mitózy. AURKA je prostřednictvím svého vazebného partnera Bora spojena s PLK1, a Bora dále stimuluje fosforylaci PLK1 Aurora kinázou A. Fosforylovaná PLK1 pak pokračuje v signální kaskádě, která vede k fosforylaci CDK1 a ta navozuje vstup do mitózy (Joukov a De Nicolo, 2018).

V roce 2020 Little a kol. prezentovali výsledky studie zaměřené na význam aktivity PLK1 v kontextu LISD, jež prokazují účast PLK1 na vzniku a tvorbě LISD. K provedení experimentů Little a kol. použili *Plk1* cKO oocyty, nikoliv WT oocyty s inhibovanou PLK1 aktivitou jako v práci So a kol. (2019). V *Plk1* cKO oocytech nedošlo k lokalizaci TACC3 do LISD a AURKA na dělicí vřeténko. PLK1 je nejspíše zodpovědná za lokalizaci AURKA na MTOC a póly dělicího vřeténka, AURKA je pak zodpovědná za lokalizaci TACC3. Výsledky experimentů Little a kol. s *Plk1* cKO odporují výsledkům publikovaným So a kol., kteří během experimentů využili farmakologické inhibice PLK1 (So a kol., 2019; Little a Jordan, 2020).

K savčím oocytům se vztahuje kooperace AURKA a PLK4. Ty společně stimulují rychlý růst mikrotubulů a formaci acentrozomálního dělicího vřeténka u myších oocytů. PLK4 se po znovuzahájení meiózy po zastavení v profázi I váže na MTOC a spouští nukleaci mikrotubulů. Jak AURKA, tak PLK4 mají individuální i překrývající se funkce v nukleaci mikrotubulů. AURKA je potřeba pro vytvoření správného počtu a velikosti MTOC a PLK4 je schopna fosforylovat a tím i regulovat aktivitu AURKA u savčích oocytů. Společně s Ran-GTP, PLK4 a AURKA se podílejí na vzniku bipolárního vřeténka dělicího vřeténka v meióze I. Inhibice kteréhokoliv z těchto tří faktorů vedla ke snížené nukleaci mikrotubulů, což potvrzuje jejich význam (Bury a kol., 2017).

Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo představit proteinkinázy regulující buněčný cyklus, zejména proteinkinázy účastnící se výstavby dělicího vřeténka a následné segregace chromozomů v meióze savčích oocytů, popsat jejich vzájemný vztah a porovnat jejich roli v meióze savčích oocytů a v mitóze.

Kromě přední proteinkinázy CDK1, která reguluje buněčný cyklus mitotických i meiotických buněk, jsou patrně vedoucími regulačními mechanismy meiózy Aurora a Polo-like kinázy. Většina známých zástupců těchto serin/treoninových regulačních kináz je známá především v kontextu mitózy, kde bylo mnoho mechanismů regulace již dobře prozkoumáno. Spolu s dalšími regulačními mechanismy se podílejí na rozpadu jaderné membrány, výstavbě dělicího vřeténka, připojení kinetochor na mikrotubuly dělicího vřeténka, segregaci chromozomů a cytokinezi.

Význam Aurora a Polo-like kináz byl prokázán i u meiózy, která dává vzniku pohlavním buňkám. Chybným rozdělením chromozomů u pohlavních buněk vznikají aneuploidie, ke kterým jsou silně náchylné savčí, zejména lidské oocyty. Podle některých zdrojů z center pro léčbu neplodnosti je více než 20 % lidských oocytů aneuploidní a jsou nejčastější příčinou vzniku závažných vrozených vad či neplodnosti. Ke vzniku aneuploidii u oocytů nejčastěji dochází v důsledku chybné segregace homologních chromozomů v prvním meiotickém dělení, ke kterým může dojít v souvislosti s výstavbou defektního dělicího vřeténka.

Aurora a Polo-like kinázy zastávají v meióze specifické funkce, kterými regulují signální dráhy vedoucí ke vzniku oocyty schopného dalšího vývoje. Signální dráhy těchto kináz ovlivňují důležité meiotické procesy samostatně i ve vzájemné synergii. I přes nedávné, významné pokroky v této oblasti, zůstávají detaily funkcí těchto proteinkináz v meióze předmětem výzkumu.

Ve své diplomové práci bych se chtěla zaměřit na vztah PLK1 a AURK, jejichž samostatné funkce jsou známy a shrnuty v této rešerši. Není však jasné, jak PLK1 s Aurora kinázami kooperuje. Kvůli známému vztahu PLK1 a AURKA u somatických buněk předpokládáme, že spolupracují i v meiotických buňkách. Jestli tyto kinázy nějakým způsobem kooperují během maturace oocyty a zda mají nějaký regulační vztah plánuji ověřit na modelu myších oocytů pomocí inhibice aktivity PLK1 a oocyty KO (resp. cKO) AURK myši.

Použitá literatura

- Abe, S., Nagasaka, K., Hirayama, Y., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Aoyagi, Y., Obuse, C., and Hirota, T. (2011). The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. *Genes Dev.* 25, 863–874.
- Adams, R.R., Carmena, M., and Earnshaw, W.C. (2001). Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol* 11, 49–54.
- Aguirre-Portolés, C., Bird, A.W., Hyman, A., Cañamero, M., de Castro, I., and Malumbres, M. (2012). Tpx2 controls spindle integrity, genome stability, and tumor development. *Cancer Res* 72, 1518–1528.
- Alfieri, C., Zhang, S., and Barford, D. (2017). Visualizing the complex functions and mechanisms of the anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C). *Open Biol.* 7, 170204.
- Andrysik, Z., Bernstein, W.Z., Deng, L., Myer, D.L., Li, Y.Q., Tischfield, J.A., Stambrook, P.J., and Bahassi, E.M. (2010). The novel mouse Polo-like kinase 5 responds to DNA damage and localizes in the nucleolus. *Nucleic Acids Res.* 38, 2931–2943.
- Balboula, A.Z., and Schindler, K. (2014). Selective disruption of aurora C kinase reveals distinct functions from aurora B kinase during meiosis in mouse oocytes. *PLoS Genet* 10, e1004194.
- Balboula, A.Z., Nguyen, A.L., Gentilello, A.S., Quartuccio, S.M., Drutovic, D., Solc, P., and Schindler, K. (2016). Haspin kinase regulates microtubule-organizing center clustering and stability through Aurora kinase C in mouse oocytes. *J Cell Sci* 129, 3648–3660.
- Barr, A.R., and Gergely, F. (2007). Aurora-A: The maker and breaker of spindle poles. *J. Cell Sci.* 120, 2987–2996.
- Barr, F.A., Silljé, H.H., and Nigg, E.A. (2004). Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 429–440.
- Bayliss, R., Sardon, T., Vernos, I., and Conti, E. (2003). Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Mol. Cell* 12, 851–862.
- Brinster, R.L. (2007). Male germline stem cells: From mice to men. *Science* (80-.). 316, 404–405.
- Brittle, A.L., and Ohkura, H. (2005). Centrosome maturation: Aurora lights the way to the poles. *Curr. Biol.* 15, R880-2.
- Broad, A.J., DeLuca, K.F., and DeLuca, J.G. (2020). Aurora B kinase is recruited to multiple discrete kinetochore and centromere regions in human cells. *J. Cell Biol.* 219, e201905144.
- Brunet, S., Dumont, J., Lee, K.W., Kinoshita, K., Hikal, P., Gruss, O.J., Maro, B., and Verlhac, M.H. (2008). Meiotic regulation of TPX2 protein levels governs cell cycle progression in mouse oocytes. *PLoS One* 3, e3338.

- Buonomo, S.B.C., Clyne, R.K., Fuchs, J., Loidl, J., Uhlmann, F., and Nasmyth, K. (2000). Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. *Cell* 103, 387–398.
- Bury, L., Coelho, P.A., Simeone, A., Ferries, S., Eyers, C.E., Eyers, P.A., Zernicka-Goetz, M., and Glover, D.M. (2017). Plk4 and Aurora A cooperate in the initiation of acentriolar spindle assembly in mammalian oocytes. *J Cell Biol* 216, 3571–3590.
- Canipari, R. (2000). Oocyte-granulosa cell interactions. *Hum Reprod Update* 6, 279–289.
- Carabatsos, M.J., Combelles, C.M., Messinger, S.M., and Albertini, D.F. (2000). Sorting and reorganization of centrosomes during oocyte maturation in the mouse. *Microsc Res Tech* 49, 435–444.
- Carazo-Salas, R.E., Gruss, O.J., Mattaj, I.W., and Karsenti, E. (2001). Ran-GTP coordinates regulation of microtubule nucleation and dynamics during mitotic-spindle assembly. *Nat. Cell Biol.* 3, 228–234.
- Carmena, M., and Earnshaw, W.C. (2003). The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 842–854.
- Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H., and Earnshaw, W.C. (2012). The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 789–803.
- de Castro, I.J., Gil, R.S., Ligamari, L., Di Giacinto, M.L., and Vagnarelli, P. (2018). CDK1 and PLK1 co-ordinate the disassembly and re-assembly of the nuclear envelope in vertebrate mitosis. *Oncotarget* 9, 7763–7773.
- Cavazza, T., and Vernos, I. (2016). The Ran-GTP pathway: From nucleo-cytoplasmic transport to spindle assembly and beyond. *Front. Cell Dev. Biol.* 3, 82.
- Channing, C.P., Schaerf, F.W., Anderson, L.D., and Tsafiriri, A. (1980). Ovarian follicular and luteal physiology. *Int. Rev. Physiol.* 22, 117–201.
- Cheeseman, I.M. (2014). The Kinetochore. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a015826.
- Chen, H.L., Tang, C.J.C., Chen, C.Y., and Tang, T.K. (2005). Overexpression of an Aurora-C kinase-deficient mutant disrupts the Aurora-B/INCENP complex and induces polyploidy. *J. Biomed. Sci.* 12, 297–310.
- Chiang, T., Duncan, F.E., Schindler, K., Schultz, R.M., and Lampson, M.A. (2010). Evidence that weakened centromere cohesion is a leading cause of age-related aneuploidy in oocytes. *Curr Biol* 20, 1522–1528.
- Clarke, P.R., and Zhang, C. (2008). Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 464–477.
- Clift, D., and Schuh, M. (2015). A three-step MTOC fragmentation mechanism facilitates bipolar spindle assembly in mouse oocytes. *Nat Commun* 6, 7217.
- Coelho, P.A., Bury, L., Sharif, B., Riparbelli, M.G., Fu, J., Callaini, G., Glover, D.M., and Zernicka-Goetz,

- M. (2013). Spindle formation in the mouse embryo requires Plk4 in the absence of centrioles. *Dev Cell* 27, 586–597.
- Colombié, N., Cullen, C.F., Brittle, A.L., Jang, J.K., Earnshaw, W.C., Carmena, M., McKim, K., and Ohkura, H. (2008). Dual roles of incenp crucial to the assembly of the acentrosomal metaphase spindle in female meiosis. *Development* 135, 3239–3246.
- Combes, G., Alharbi, I., Braga, L.G., and Elowe, S. (2017). Playing polo during mitosis: PLK1 takes the lead. *Oncogene* 36, 4819–4827.
- Cooper, G.M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition, 689 pages. ISBN-10: 0-87893-106-6
- Courtois, A., Schuh, M., Ellenberg, J., and Hiiragi, T. (2012). The transition from meiotic to mitotic spindle assembly is gradual during early mammalian development. *J Cell Biol* 198, 357–370.
- Davydenko, O., Schultz, R.M., and Lampson, M.A. (2013). Increased CDK1 activity determines the timing of kinetochore-microtubule attachments in meiosis I. *J Cell Biol* 202, 221–229.
- Dieterich, K., Soto Rifo, R., Karen Faure, A., Hennebicq, S., Amar, B. Ben, Zahi, M., Perrin, J., Martinez, D., Sèle, B., Jouk, P.S., et al. (2007). Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat. Genet.* 39, 661–665.
- Dieterich, K., Zouari, R., Harbuz, R., Vialard, F., Martinez, D., Bellayou, H., Prisant, N., Zoghmar, A., Guichaoua, M.R., Koscinski, I., et al. (2009). The Aurora Kinase C c.144delC mutation causes meiosis I arrest in men and is frequent in the North African population. *Hum. Mol. Genet.* 18, 1301–1309.
- Drutovic, D., Duan, X., Li, R., Kalab, P., and Solc, P. (2020). Ran-GTP and importin β regulate meiosis I spindle assembly and function in mouse oocytes. *EMBO J* 39, e101689.
- Feitosa, W.B., Hwang, K., and Morris, P.L. (2018). Temporal and SUMO-specific SUMOylation contribute to the dynamics of Polo-like kinase 1 (PLK1) and spindle integrity during mouse oocyte meiosis. *Dev Biol* 434, 278–291.
- FitzHarris, G. (2012). Anaphase B precedes anaphase A in the mouse egg. *Curr Biol* 22, 437–444.
- Foley, E.A., and Kapoor, T.M. (2013). Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 25–37.
- Gilbert, S.F. (2000). *Developmental Biology*. 6th edition, 709 pages. ISBN-10: 0878932437
- Goldenson, B., and Crispino, J.D. (2015). The aurora kinases in cell cycle and leukemia. *Oncogene* 34, 537–545.
- Gruss, O. (2018). Animal Female Meiosis: The Challenges of Eliminating Centrosomes. *Cells* 7, 73.
- Gueth-Hallonet, C., Antony, C., Aghion, J., Santa-Maria, A., Lajoie-Mazenc, I., Wright, M., and Maro, B. (1993). gamma-Tubulin is present in acentriolar MTOCs during early mouse development. *J. Cell Sci.* 105, 157 LP – 166.

- Habedanck, R., Stierhof, Y.D., Wilkinson, C.J., and Nigg, E.A. (2005). The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. *Nat. Cell Biol.* 7, 1140–1146.
- Hanks, S.K., and Hunter, T. (1995). The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification 1. *FASEB J.* 9, 576–596.
- Hassold, T., and Hunt, P. (2009). Maternal age and chromosomally abnormal pregnancies: what we know and what we wish we knew. *Curr Opin Pediatr* 21, 703–708.
- Hirano, T. (2015). Chromosome dynamics during mitosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, 1–15.
- Holland, A.J., and Cleveland, D.W. (2009). Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 478–487.
- Holubcová, Z., Blayney, M., Elder, K., and Schuh, M. (2015). Human oocytes. Error-prone chromosome-mediated spindle assembly favors chromosome segregation defects in human oocytes. *Science.* 348, 1143–1147.
- Hunter, T. (1991). Protein Kinase Classification. *Methods* 200, 3–37.
- Jeyapragash, A.A., Klein, U.R., Lindner, D., Ebert, J., Nigg, E.A., and Conti, E. (2007). Structure of a Survivin-Borealin-INCENP Core Complex Reveals How Chromosomal Passengers Travel Together. *Cell* 131, 271–285.
- Joukov, V., and De Nicolo, A. (2018). Aurora-PLK1 cascades as key signaling modules in the regulation of mitosis. *Sci Signal* 11, eaar4195.
- Joukov, V., De Nicolo, A., Rodriguez, A., Walter, J.C., and Livingston, D.M. (2010). Centrosomal protein of 192 kDa (Cep192) promotes centrosome-driven spindle assembly by engaging in organelle-specific Aurora A activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 21022–21027.
- Joukov, V., Walter, J.C., and De Nicolo, A. (2014). The Cep192-Organized Aurora A-Plk1 Cascade Is Essential for Centrosome Cycle and Bipolar Spindle Assembly. *Mol. Cell* 55, 578–591.
- Kapoor, T.M. (2017). Metaphase Spindle Assembly. *Biol.* 6, 8.
- Kimura, M., Matsuda, Y., Yoshioka, T., and Okano, Y. (1999). Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human Aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3. *J. Biol. Chem.* 274, 7334–7340.
- Kimura, M., Uchida, C., Takano, Y., Kitagawa, M., and Okano, Y. (2004). Cell cycle-dependent regulation of the human aurora B promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316, 930–936.
- Kufer, T.A., Silljé, H.H.W., Körner, R., Gruss, O.J., Meraldi, P., and Nigg, E.A. (2002). Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *J. Cell Biol.* 158, 617–623.
- Kumar, S., Sharma, A.R., Sharma, G., Chakraborty, C., and Kim, J. (2016). PLK-1: Angel or devil for cell cycle progression. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1865, 190–203.
- Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F.G., and Taylor, S.S. (2012). The spindle assembly checkpoint. *Curr. Biol.*

- Li, X., Sakashita, G., Matsuzaki, H., Sugimoto, K., Kimura, K., Hanaoka, F., Taniguchi, H., Furukawa, K., and Urano, T. (2004). Direct association with inner centromere protein (INCENP) activates the novel chromosomal passenger protein, Aurora-C. *J Biol Chem* 279, 47201–47211.
- Liang, S., Zhao, M.H., Guo, J., Choi, J. woo, Kim, N.H., and Cui, X.S. (2016). Polo-like kinase 4 regulates spindle and actin assembly in meiosis and influence of early embryonic development in bovine oocytes. *Theriogenology* 85, 754-761.
- Liao, Y., Lin, D., Cui, P., Abbasi, B., Chen, C., Zhang, Z., Zhang, Y., Dong, Y., Rui, R., and Ju, S. (2018). Polo-like kinase 1 inhibition results in misaligned chromosomes and aberrant spindles in porcine oocytes during the first meiotic division. *Reprod. Domest. Anim.* 53, 256–265.
- Little, T.M., and Jordan, P.W. (2020). PLK1 is required for chromosome compaction and microtubule organization in mouse oocytes. *Mol. Biol. Cell* 31, 1206-1217.
- Littlepage, L.E., Wu, H., Andresson, T., Deanehan, J.K., Amundadottir, L.T., and Ruderman, J. V. (2002). Identification of phosphorylated residues that affect the activity of the mitotic kinase Aurora-A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15440–15445.
- Luksza, M., Queguigner, I., Verlhac, M.H., and Brunet, S. (2013). Rebuilding MTOCs upon centriole loss during mouse oogenesis. *Dev Biol* 382, 48–56.
- Luo, Y.-B., and Kim, N.-H. (2015). PLK4 Is Essential for Meiotic Resumption in Mouse Oocytes1. *Biol. Reprod.* 92, 101.
- Ma, H.T., and Poon, R.Y.C. (2011). How protein kinases co-ordinate mitosis in animal cells. *Biochem. J.* 435, 17–31.
- MacLennan, M., Crichton, J.H., Playfoot, C.J., and Adams, I.R. (2015). Oocyte development, meiosis and aneuploidy. *Semin Cell Dev Biol* 45, 68–76.
- Magnaghi-Jaulin, L., Eot-Houllier, G., Gallaud, E., and Giet, R. (2019). Aurora a protein kinase: To the centrosome and beyond. *Biomolecules* 9, 28.
- Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* 15, 122.
- Mihajlović, A.I., and FitzHarris, G. (2018). Segregating Chromosomes in the Mammalian Oocyte. *Curr. Biol.* 28, R895–R907.
- Mogessie, B., Scheffler, K., and Schuh, M. (2018). Assembly and Positioning of the Oocyte Meiotic Spindle. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 34, 381–403.
- Moyer, T.C., and Holland, A.J. (2019). Plk4 promotes centriole duplication by phosphorylating stil to link the procentriole cartwheel to the microtubule wall. *Elife* 8, e46054.
- Mullen, T.J., Davis-Roca, A.C., and Wignall, S.M. (2019). Spindle assembly and chromosome dynamics during oocyte meiosis. *Curr Opin Cell Biol* 60, 53–59.

- Nagaoka, S.I., Hassold, T.J., and Hunt, P.A. (2012). Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet* 13, 493–504.
- Nguyen, A.L., and Schindler, K. (2017). Specialize and Divide (Twice): Functions of Three Aurora Kinase Homologs in Mammalian Oocyte Meiotic Maturation. *Trends Genet* 33, 349–363.
- Nguyen, A.L., Gentilello, A.S., Balboula, A.Z., Shrivastava, V., Ohring, J., and Schindler, K. (2014). Phosphorylation of threonine 3 on histone H3 by haspin kinase is required for meiosis I in mouse oocytes. *J Cell Sci* 127, 5066–5078.
- Nguyen, A.L., Marin, D., Zhou, A., Gentilello, A.S., Smoak, E.M., Cao, Z., Fedick, A., Wang, Y., Taylor, D., Scott, R.T., et al. (2017). Identification and characterization of aurora kinase B and C variants associated with maternal aneuploidy. *Mol. Hum. Reprod.* 23, 406–416.
- Nguyen, A.L., Drutovic, D., Vazquez, B.N., El Yakoubi, W., Gentilello, A.S., Malumbres, M., Solc, P., and Schindler, K. (2018). Genetic Interactions between the Aurora Kinases Reveal New Requirements for AURKB and AURKC during Oocyte Meiosis. *Curr Biol* 28, 3458-3468.e5.
- Ohkura, H. (2015). Meiosis: an overview of key differences from mitosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a015859.
- Ong, J.Y., and Torres, J.Z. (2019). Dissecting the mechanisms of cell division. *J Biol Chem* 294, 11382–11390.
- Page, S.L., and Hawley, R.S. (2003). Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* (80-.). 301, 785–789.
- Pepling, M.E. (2006). From primordial germ cell to primordial follicle: Mammalian female germ cell development. *Genesis* 44, 622–632.
- Petronczki, M., Lénárt, P., and Peters, J.M. (2008). Polo on the Rise-from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1. *Dev Cell* 14, 646–659.
- Quartuccio, S.M., and Schindler, K. (2015). Functions of Aurora kinase C in meiosis and cancer. *Front Cell Dev Biol* 3, 50.
- Radford, S.J., Nguyen, A.L., Schindler, K., and McKim, K.S. (2017). The chromosomal basis of meiotic acentrosomal spindle assembly and function in oocytes. *Chromosoma* 126, 351–364.
- Rimon-Dahari, N., Yerushalmi-Heinemann, L., Alyagor, L., and Dekel, N. (2016). Ovarian folliculogenesis. *Results Probl. Cell Differ.* 58, 167–190.
- Sanders, J.R., and Jones, K.T. (2018). Regulation of the meiotic divisions of mammalian oocytes and eggs. *Biochem Soc Trans* 46, 797–806.
- Sasai, K., Katayama, H., Hawke, D.H., and Sen, S. (2016). Aurora-C interactions with survivin and incenp reveal shared and distinct features compared with aurora-B chromosome passenger protein complex. *PLoS One* 11, e0157305.

- Schafer, K.A. (1998). The Cell Cycle: A Review. *Vet. Pathol.* 35, 461–478.
- Schindler, K. (2011). Protein kinases and protein phosphatases that regulate meiotic maturation in mouse oocytes. *Results Probl. Cell Differ.* 53, 309–341.
- Schindler, K., Davydenko, O., Fram, B., Lampson, M.A., and Schultz, R.M. (2012). Maternally recruited Aurora C kinase is more stable than Aurora B to support mouse oocyte maturation and early development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E2215.
- Schuh, M., and Ellenberg, J. (2007). Self-organization of MTOCs replaces centrosome function during acentrosomal spindle assembly in live mouse oocytes. *Cell* 130, 484–498.
- Severson, A.F., von Dassow, G., and Bowerman, B. (2016). Oocyte Meiotic Spindle Assembly and Function. *Curr Top Dev Biol* 116, 65–98.
- Shuda, K., Schindler, K., Ma, J., Schultz, R.M., and Donovan, P.J. (2009). Aurora kinase B modulates chromosome alignment in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 76, 1094–1105.
- So, C., Seres, K.B., Steyer, A.M., Mönnich, E., Clift, D., Pejkovska, A., Möbius, W., and Schuh, M. (2019). A liquid-like spindle domain promotes acentrosomal spindle assembly in mammalian oocytes. *Science*. 364, eaat9557.
- Solc, P., Kitajima, T.S., Yoshida, S., Brzakova, A., Kaido, M., Baran, V., Mayer, A., Samalova, P., Motlik, J., and Ellenberg, J. (2015). Multiple requirements of PLK1 during mouse oocyte maturation. *PLoS One* 10, e0116783.
- Sorokin, A. V., Kim, E.R., and Ovchinnikov, L.P. (2007). Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochem.* 72, 1439–1457.
- Tang, C.J.C., Lin, C.Y., and Tang, T.K. (2006). Dynamic localization and functional implications of Aurora-C kinase during male mouse meiosis. *Dev. Biol.* 290, 398–410.
- Tseng, B.S., Tan, L., Kapoor, T.M., and Funabiki, H. (2010). Dual detection of chromosomes and microtubules by the chromosomal passenger complex drives spindle assembly. *Dev. Cell* 18, 903–912.
- Vaid, R., Sharma, N., Chauhan, S., Deshta, A., Dev, K., and Sourirajan, A. (2016). Functions of Polo-Like Kinases: A Journey From Yeast To Humans. *Protein Pept Lett* 23, 185–197.
- Verlhac, M.H., Lefebvre, C., Guillaud, P., Rassinier, P., and Maro, B. (2000). Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos. *Curr Biol* 10, 1303–1306.
- Vertii, A., Hehnly, H., and Doxsey, S. (2016). The Centrosome, a Multitalented Renaissance Organelle. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8, a025049.
- Wang, H.Y., Choe, M.H., Lee, I.W., Namgoong, S., Kim, J.S., Kim, N.H., and Oh, J.S. (2018). Erratum: Correction: CIP2A acts as a scaffold for CEP192-mediated microtubule organizing center assembly by recruiting Plk1 and aurora A during meiotic maturation (Development (Cambridge, England)

- (2017) 144 20 (3829-3839) PII: de. *Development* 145, 3829–3839.
- Watanabe, Y. (2012). Geometry and force behind kinetochore orientation: lessons from meiosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 370–382.
- Webster, A., and Schuh, M. (2017). Mechanisms of Aneuploidy in Human Eggs. *Trends Cell Biol* 27, 55–68.
- Wignall, S.M., and Villeneuve, A.M. (2009). Lateral microtubule bundles promote chromosome alignment during acentrosomal oocyte meiosis. *Nat. Cell Biol.* 11, 839–844.
- Yanagida, M. (2014). The role of model organisms in the history of mitosis research. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a015768.
- Yoshida, S., Kaido, M., and Kitajima, T.S. (2015). Inherent Instability of Correct Kinetochore-Microtubule Attachments during Meiosis I in Oocytes. *Dev. Cell* 33, 589–602.
- Zhai, R., Yuan, Y.F., Zhao, Y., Liu, X.M., Zhen, Y.H., Yang, F.F., Wang, L., Huang, C.Z., Cao, J., and Huo, L.J. (2013). Bora regulates meiotic spindle assembly and cell cycle during mouse oocyte meiosis. *Mol Reprod Dev* 80, 474–487.
- Zitouni, S., Nabais, C., Jana, S.C., Guerrero, A., and Bettencourt-Dias, M. (2014). Polo-like kinases: structural variations lead to multiple functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 433–452.